

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ENDOFÍTICA
ASOCIADA A LAS GRAMÍNEAS**
Dactylis glomerata, Holcus lanatus,
Ammophila arenaria y Elymus farctus

M^a Salud Sánchez Márquez

2009

DR. ÍÑIGO ZABALGOGEAZCOA GONZÁLEZ, CIENTÍFICO TITULAR DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), EN EL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA,

CERTIFICA

Que la memoria titulada “ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ENDOFÍTICA ASOCIADA A LAS GRAMÍNEAS *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*”, presentada por Dña. M^a Salud Sánchez Márquez para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo mi dirección, en el Departamento de Estrés Abiótico del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 20 de febrero de 2009.

Fdo. Dr. Iñigo Zabalgogeoazcoa González

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Aspectos históricos de la investigación sobre hongos endofíticos	10
1.2. <i>Epichloë</i> y <i>Neotyphodium</i> , los hongos endofíticos sistémicos de gramíneas ..	12
1.2.1. Ciclos de vida de <i>Epichloë</i> y <i>Neotyphodium</i>	13
1.2.2. Efectos beneficiosos de <i>Epichloë</i> y <i>Neotyphodium</i>	16
1.2.3. Efectos perjudiciales de los endofitos en el ganado	18
1.3. Hongos endofíticos no <i>Epichloë</i>	19
1.3.1. Abundancia y diversidad taxonómica	20
1.3.2. Especificidad de tejidos	21
1.3.3. Especificidad por el hospedador	22
1.3.4. Transmisión	23
1.3.5. Tipos de interacción planta-hongo endofítico	24
1.3.6. Interacciones mutualistas	26
1.4. Importancia del estudio de los hongos endofíticos	28
1.5. Técnicas moleculares aplicadas a la identificación de hongos endofíticos	31
1.6. Las gramíneas	33
1.6.1. Características generales	34
1.6.2. Distribución	36
1.6.3. Importancia económica	37
1.6.4. Especies de gramíneas analizadas	39
1.6.4.1. <i>Dactylis glomerata</i>	39
1.6.4.2. <i>Holcus lanatus</i>	41
1.6.4.3. <i>Ammophila arenaria</i>	42
1.6.4.4. <i>Elymus farctus</i>	43
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Recolección de muestras	51
3.2. Aislamiento de hongos	53

	Página
3.3. Identificación de los aislados	56
3.3.1. Morfológica	56
3.3.2. Molecular	57
3.4. Cuantificación de la diversidad fúngica	60
3.4.1. Índices de diversidad	60
3.4.2. Curvas de acumulación de especies	61
3.4.3. Estimadores del número total de especies	63
3.4.4. Comparaciones de la micobiota entre hospedadores, tipos de tejidos y localidades	65
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1. Micobiota endofítica de <i>Dactylis glomerata</i>	69
4.1.1. Aislamiento de endofitos	69
4.1.2. Valor de las secuencias parciales para la identificación	70
4.1.3. Identificación de los aislados	72
4.1.4. Abundancia y diversidad biológica	81
4.1.5. Discusión	85
4.2. Micobiota endofítica de <i>Holcus lanatus</i>	91
4.2.1. Aislamiento de endofitos	91
4.2.2. Identificación de los aislados	92
4.2.3. Abundancia y diversidad biológica	104
4.2.4. Comparación entre la micobiota de hojas y raíces	105
4.2.5. Efectos geográficos en la composición de especies.....	111
4.2.6. Discusión	113
4.3. Micobiota endofítica de <i>Ammophila arenaria</i> y <i>Elymus farctus</i>	117
4.3.1. Aislamiento de endofitos	117
4.3.2. Identificación de los aislados	118
4.3.3. Abundancia y diversidad biológica	126
4.3.4. Comparación entre hospedadores	129
4.3.5. Comparación entre hojas y rizomas	130
4.3.6. Efectos geográficos en la composición de especies	132

	Página
4.3.7. Discusión	136
5. DISCUSIÓN GENERAL	143
5.1. Patrones de diversidad biológica en la micobiota endofítica de gramíneas	145
5.2. Problemas en la estimación del número total de especies endofíticas en gramíneas.....	151
5.3. Composición taxonómica de la micobiota endofíticas	152
5.4. Características de las especies únicas y dominantes	157
5.5. Especificidad de órganos	161
5.6. Estacionalidad	163
5.7. Función ecológica de las especies endofíticas	165
6. CONCLUSIONES	173
7. APÉNDICE	177
8. BIBLIOGRAFÍA	197
9. PUBLICACIONES	227

INTRODUCCIÓN

El cultivo de gramíneas y su importancia para el ganado fue reconocido rápidamente durante el despertar de la civilización humana. No resultó complicado para aquellos primeros pueblos descubrir las ventajas que podía conferirles el hecho de domesticar unas pocas plantas y convertirse de este modo, de nómadas errantes a pueblos sedentarios. Aquella época fue el germen de la agricultura y el nacimiento de nuestros actuales cultivos de gramíneas (Figura 1).



Figura 1. Campo sembrado con plantas de maíz, actualmente el cereal con mayor volumen de producción en el mundo.

Esas gramíneas, y parece ser que el resto de las plantas que viven en la tierra establecen simbiosis con hongos. Estos hongos son importantes en la estructura, función, y salud de las comunidades de plantas (Giovannetti y Mosse, 1980; Petrini, 1986; Bacon y Hill, 1996; Gemma y Koske, 1997; van der Heijden *et al.*, 1998; Clay y Holah, 1999). Además, la simbiosis con hongos contribuye, y puede ser responsable, de la adaptación de las plantas al estrés ambiental. De hecho, la mayoría, si no todas las plantas estudiadas en ecosistemas naturales, están infectadas por hongos que no causan síntomas visibles de enfermedad. Son los llamados **hongos endofíticos**.

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE HONGOS ENDOFÍTICOS.

Durante los últimos 30 años, el término endofito ha aparecido cada vez con más frecuencia en la literatura científica. Aunque el origen del término provenga del siglo XIX, cuando Antón de Bary lo utilizó para describir hongos que viven en el interior de las plantas (de Bary, 1866), su significado contemporáneo es diferente del original. Actualmente se usa este término para referirse a hongos capaces de infectar plantas aparentemente sanas sin causar síntomas (Large, 1940; Carroll, 1986). Es decir, en el más amplio de los sentidos, los hongos endofíticos son aquellos que colonizan tejidos vivos de plantas sin ocasionar ningún efecto negativo, inmediato o visible (Hirsch y Braun, 1992).

Los primeros estudios de endofitos se realizaron en plantas de la familia de las gramíneas. A finales del siglo XIX, varios científicos europeos describieron la presencia de micelio fúngico en los carpelos y semillas de plantas sanas de *Lolium arvense*, *Lolium linicolum*, *Lolium remotum* y *Lolium temulentum* (Guerin, 1898a, 1898b; Hanausek, 1898; Nestler, 1898; Vogl, 1898; Neubauer y Remer, 1902). La cizaña (*Lolium temulentum*) ya era conocida como una mala hierba en cultivos de cereal en la antigüedad. Además, esta planta poseía propiedades tóxicas que con el descubrimiento de los endofitos fueron atribuidas al micelio fúngico (Font Quer, 1961). Estudios realizados por Freeman (1904) sobre el hongo endofítico de *L. temulentum* demostraron que este hongo se transmitía por semilla, ya que sus hifas penetraban en el embrión antes de que las semillas madurasen, y tras la germinación el hongo coordinaba su crecimiento con el de los tejidos de la planta, llegando a colonizar los meristemos laterales y después las inflorescencias. A principios de 1930 investigaciones realizadas en los Estados Unidos y Canadá demostraron la relación entre los endofitos y la toxicidad de *L. temulentum* para el ganado (Kingsbury, 1964).

Una vez demostrada la relación, se especuló acerca de la posición taxonómica del endofito de esta gramínea. Freeman (1906), sugirió que eran Ustilaginales que habían perdido la capacidad de esporular en sus hospedadores, argumento basado en las similitudes de los ciclos de vida del endofito de *L. temulentum* y el del hongo patógeno *Ustilago tritici* en trigo; más tarde clasificó los endofitos de *Lolium* en el grupo de los Clavicipitales tras estudiar su transmisión. Muenscher (1939) y Kingsbury (1964) los

asociaron con el hongo *Endoconidium temulentum*, conocido por su toxicidad en semillas de plantas de *L. temulentum*. Sampson (1933, 1935) vio un paralelismo entre los endofitos de *Lolium temulentum* y *Lolium perenne* con algunas especies endofíticas del género *Epichloë* asociadas a plantas de *Festuca rubra* (*Epichloë festucae*) y *Dactylis glomerata* (*Epichloë typhina*). Además, observó que *Epichloë festucae* puede manifestar su ciclo sexual o asexual en diferentes tallos de la misma planta. Neill (1940, 1941), cultivó endofitos de *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne*, y propuso que eran cepas de *Epichloë typhina* basándose en las similitudes morfológicas de sus células conidiógenas y conidios. Finalmente, el endofito de *Lolium temulentum* ha sido clasificado como *Neotyphodium occultans*, una especie asexual de la familia *Clavicipitaceae*, cercana al género *Epichloë* (Moon *et al.*, 2000).

Los estudios sobre hongos endofíticos en plantas de familias distintas de las gramíneas no comenzaron hasta los años 70, sin embargo, ya los primeros trabajos revelaron la presencia de diversas especies fúngicas en el interior de plantas pertenecientes a grupos como algas (Hawksworth, 1988), musgos (Schulz *et al.*, 1993), hepáticas (Fisher, 1996; Duckett *et al.*, 2006), coníferas (Bernstein y Carroll, 1977), palmeras (Rodrigues, 1996), cactáceas (Suryanarayanan *et al.*, 2005) y numerosas especies de árboles (Petrini y Fisher, 1990; Bissegger y Sieber, 1994; Fisher *et al.*, 1994; Suryanarayanan *et al.*, 1998; Collado *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2001) y arbustos (Petrini *et al.*, 1982; Shamoun y Sieber, 1993; Fisher *et al.*, 1995). Incluso en líquenes se han identificado especies de hongos endofíticos (Li *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, se han encontrado hongos endofíticos en todas las especies de plantas que han sido analizadas con este fin, tanto en zonas tropicales y de clima templado, como desérticas o boreales (Fisher *et al.*, 1995; Schulz y Boyle, 2005; Higgins *et al.*, 2006; Stone, 2006; Arnold *et al.*, 2007; Porras Alfaro *et al.*, 2008).

1.2. *EPICHLÖE* Y *NEOTYPHODIUM*, LOS ENDOFITOS SISTÉMICOS DE GRAMÍNEAS.

En 1977, en los Estados Unidos de América, la investigación sobre hongos endofíticos recibió un impulso considerable. Desde mediados del siglo XX, el uso de praderas artificiales de la gramínea *Festuca arundinacea* para la alimentación de ganado vacuno fue incrementándose en el centro y sur de los Estados Unidos de América. Sin embargo, a pesar del buen rendimiento agronómico de estos pastos, a menudo se observaba en los meses de verano un cuadro de intoxicación en el ganado alimentado en estas praderas. Los síntomas de este síndrome tóxico, conocido como toxicosis de festuca o festucosis, son una elevación de la temperatura corporal, inapetencia, aspereza y pérdida del brillo del pelo, abortos, gangrenas en las extremidades, orejas y cola, y reducción en la ganancia media diaria de peso (Paterson *et al.*, 1995). El origen de este problema fue descubierto por Charles Bacon y colaboradores al observar que en los pastos asociados a toxicidad en animales, el espacio intercelular de las plantas y semillas de *Festuca arundinacea* estaba colonizado sistémicamente por hifas de un hongo que identificaron primero como *Epichloë typhina* y más tarde como *Acremonium coenophialum* (Bacon *et al.*, 1977) (Figuras 2 y 3). En este periodo en Nueva Zelanda se descubrió que un síndrome tóxico observado en ovejas alimentadas en pastos de la gramínea *Lolium perenne* también se debía a la presencia de otro hongo endofítico, *Acremonium lolii* (Fletcher y Harvey, 1981). Años más tarde, se descubrió que el posible motivo de la toxicidad de los pastos infectados es que *A. coenophialum* produce varios tipos de alcaloides tóxicos tipo ergot, similares a los producidos por *Claviceps purpurea* (Lyons *et al.*, 1986).

En la actualidad, *Acremonium coenophialum* y *Acremonium lolii* han sido reclasificados en el género *Neotyphodium*, un género asexual de la familia *Clavicipitaceae* (Glenn *et al.*, 1996). Las especies del género *Neotyphodium* son asexuales y se transmiten exclusivamente por semilla. Fenotípica y genotípicamente son muy cercanas al género *Epichloë* (Phylum Ascomycota, orden Hypocreales, familia *Clavicipitaceae*); de hecho, algunas especies de *Neotyphodium* son aloploidos resultantes de hibridaciones entre especies de *Epichloë* (Schardl *et al.*, 1994).

En España, las asociaciones entre gramíneas y hongos de los géneros *Epichloë*/*Neotyphodium* son comunes en pastos naturales, donde la incidencia de infección endofítica a menudo supera el 70% en plantas de especies como *Festuca rubra* o *Festuca arundinacea* (Arroyo *et al.*, 2002; Zabalgogezcoa *et al.*, 1998, 2003; Vázquez de Aldana *et al.*, 2007).

1.2.1. Ciclos de vida de *Epichloë* y *Neotyphodium*.

La mayoría de las especies de ambos géneros muestran una especialización hacia sus huéspedes, de tal forma que cada especie sólo suele infectar a una o pocas especies del mismo género de gramíneas. Por ejemplo, el único huésped conocido de *N. coenophialum* es *Festuca arundinacea* (Figura 2), y *Epichloë festucae* sólo infecta a unas pocas especies del género *Festuca* y a *Lolium perenne*. La excepción es *Epichloë typhina*, una especie que infecta a diversas especies de gramíneas pertenecientes incluso a varios géneros, y que se distingue de otras especies del género por comportarse como un patógeno, al causar la esterilización casi completa de la planta hospedadora (Schardl *et al.*, 2004; Zabalgogezcoa *et al.*, 2008a). No obstante, se ha sugerido que *E. typhina* podría ser un complejo de especies crípticas, cada una de ella especializada en un hospedador (Schardl *et al.*, 2007).

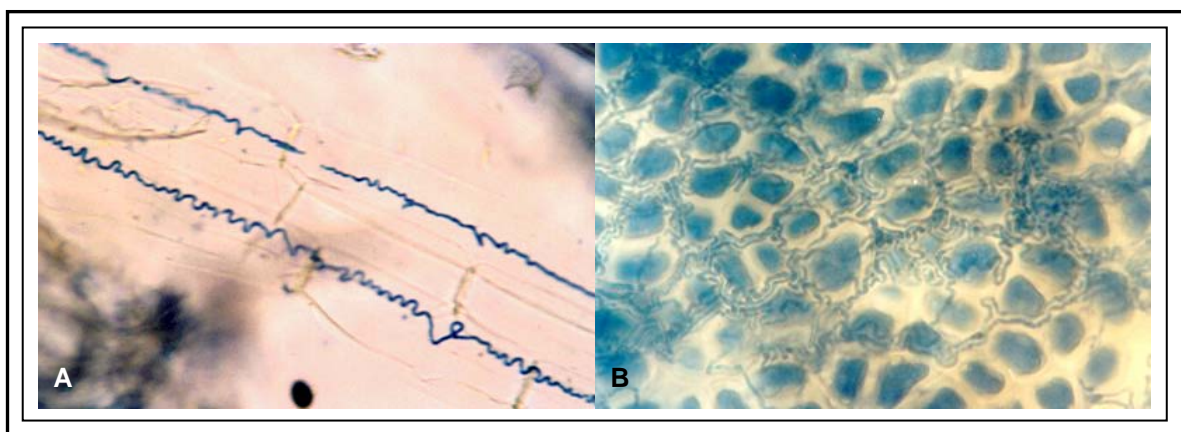


Figura 2. Hifas de *Neotyphodium coenophialum* colonizando la vaina foliar (A) y la capa de aleurona (B), de una semilla de *Festuca arundinacea*.

Mientras las plantas se encuentran en una fase de desarrollo vegetativo, las especies de *Epichloë* y *Neotyphodium* infectan sistémicamente el espacio intercelular de las partes aéreas de sus huéspedes (Figura 2). La reproducción sexual de las especies de *Epichloë* está relacionada con la formación de estromas en los tallos reproductivos de las plantas (Figura 3 y 4), y por lo tanto, el ciclo reproductivo del hongo coincide con el de la planta. Los estromas impiden la emergencia de la espiga y por lo tanto esterilizan el tallo afectado. *Epichloë* es un género heterotálico y al ser un estroma fertilizado por un conidio de sexo compatible, se desarrollan en la superficie del estroma peritecios con ascas. Las ascosporas, al ser liberadas pueden infectar flores de huéspedes, dando lugar a semillas infectadas (Figura 2B, figura 3). Algunas especies de moscas del género *Phorbia* depositan sus huevos en estromas inmaduros de *Epichloë* y al moverse de estroma en estroma para depositar huevos, actúan como 'polinizadores', transportando conidios de un estroma a otro y facilitando la fertilización. Tras la eclosión de los huevos, las larvas se alimentan del estroma (Schardl *et al.*, 2004).

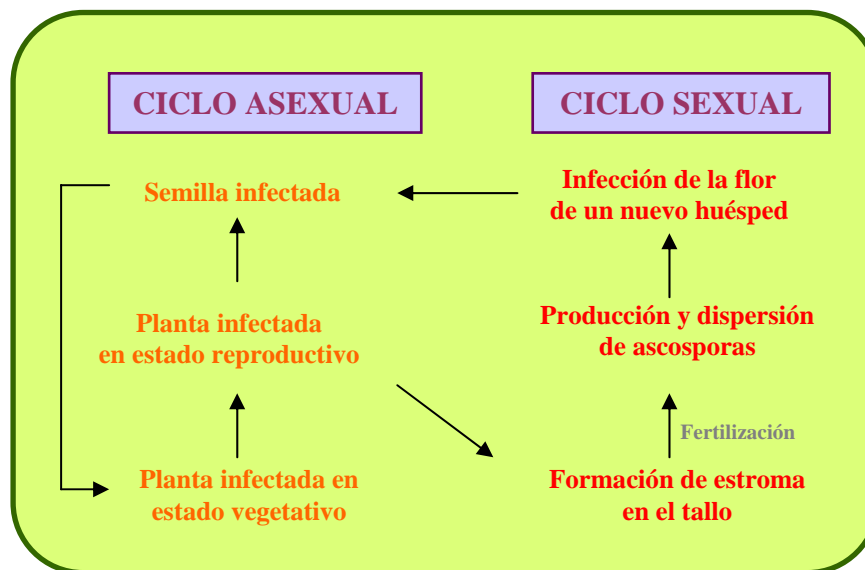


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de las especies de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium*. La reproducción de *Neotyphodium* es estrictamente asexual, mientras que la mayoría de las especies de *Epichloë* se pueden reproducir sexual y asexualmente.

En algunas especies de *Epichloë* y en todas las del género asexual *Neotyphodium*, la reproducción sexual es rara o inexistente; en estos casos, las plantas infectadas no muestran síntomas (estromas), y el hongo se transmite verticalmente por medio de la

infección de casi la totalidad de las semillas producidas por una planta infectada (Figura 3).

Según las características de su ciclo de vida, las interacciones de las especies de *Epichloë* y *Neotyphodium* con plantas han sido clasificadas en tres tipos (White, 1988):

Tipo I. Interacciones sintomáticas. Especies patógenas que forman estromas en todos los tallos reproductivos, esterilizando a la planta hospedadora. Las especies que forman asociaciones de este tipo, como por ejemplo, *Epichloë typhina* en *Brachypodium phoenicoides* (Figura 4), y *Epichloë clarkii* en *Holcus lanatus* (Figura 5A), infectan sistémicamente los tejidos vegetativos sin producir síntomas. Cuando la planta entra en estado reproductivo, el hongo produce estromas alrededor de los tallos reproductivos, impidiendo la emergencia de las inflorescencias y esterilizando las plantas. Estas especies endofíticas no se transmiten verticalmente por semilla y su reproducción es estrictamente sexual (Figura 3).



Figura 4. Estromas (a y b) formados por *Epichloë typhina* en los tallos reproductivos de una planta de *Brachypodium phoenicoides*. Tallo sano de *B. phoenicoides* (c). (Zabalgogezcoa *et al.*, 2008a).

Tipo II. Interacciones mixtas. Las especies de este tipo producen estromas en uno o en unos pocos tallos reproductivos, y sólo en unas pocas plantas infectadas. La frecuencia de plantas infectadas con síntomas suele ser menor del 1% (ej. *Epichloë festucae* – *Festuca rubra*. Figura 5B). En los tallos donde no se producen estromas, estos hongos infectan los óvulos y se transmiten verticalmente por semilla, por lo tanto, la reproducción del hongo puede ser sexual y asexual (Figura 3). La tasa de transmisión por semilla es muy elevada, cercana al 100%.

Tipo III. Interacciones asintomáticas. Estas interacciones las realizan especies asexuales que nunca forman estromas y se transmiten eficientemente por semilla (Figura 3). Todas las especies de *Neotyphodium* (ej. *N. lolii* y *N. coenophialum*, figura 5C) pertenecen a esta categoría.

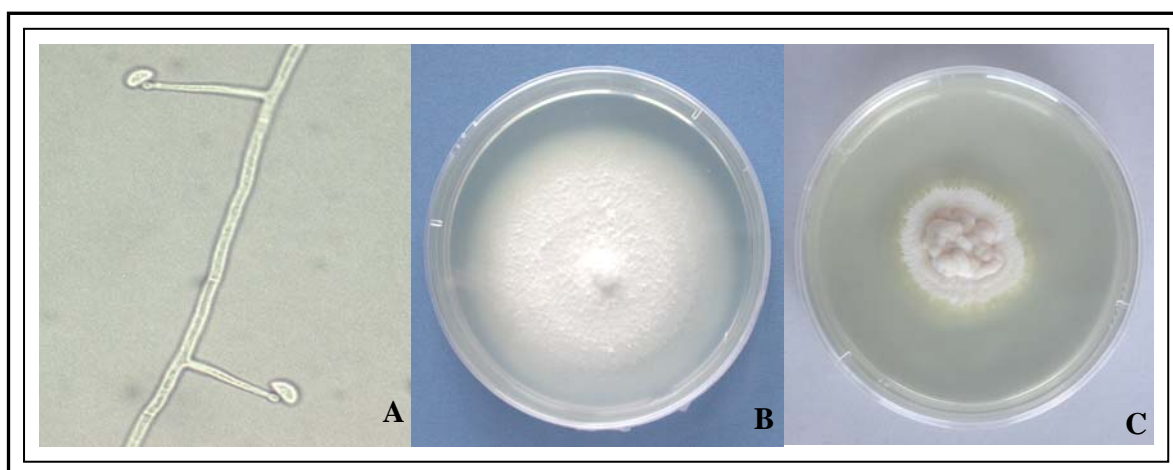


Figura 5. A. Conidióforos y conidios de una cepa de *Epichloë clarkii* aislada de *Holcus lanatus*. B. Cultivo en PDA de *Epichloë festucae* aislado de *Festuca rubra*. C. Cultivo en PDA de *Neotyphodium coenophialum* aislado de *Festuca arundinacea*.

1.2.2. Efectos beneficiosos de *Epichloë* y *Neotyphodium*.

Debido a su eficiente transmisión vertical por semilla, los endofitos de tipo II y III se heredan de manera similar a un carácter materno. Este componente *cuasi hereditario*, implica que debería ser improbable que las gramíneas albergasen endofitos asexuales si éstos no produjesen beneficios a las plantas (Clay, 1990). De hecho, son abundantes los estudios que han mostrado que estos endofitos son beneficiosos para las plantas huéspedes, aumentando su valor adaptativo, particularmente en condiciones de estrés. Las

asociaciones entre gramíneas y endofitos tipo II y III son de tipo mutualista. El hongo se beneficia del hábitat intercelular, el suministro de nutrientes y la vía de diseminación a través de las semillas que aporta la planta, mientras que ésta se beneficia de una mayor resistencia a herbívoros y patógenos, y de una mayor tolerancia a varios factores de estrés abiótico que son producto de su asociación con el endofito (Clay, 1993; Malinowski y Belesky, 2000; Zabalgogezcoa, 2008).

En relación a sus congéneres no infectados, las plantas asociadas a *Epichloë* y *Neotyphodium* son más resistentes a los ataques de unas 40 especies de insectos (Breen, 1994), de mamíferos herbívoros (Paterson *et al.*, 1995; Bazely *et al.*, 1997) y de varias especies de nematodos (West *et al.*, 1988; Timper *et al.*, 2005). La infección de *E. festucae* produce un aumento de la resistencia al hongo patógeno *Sclerotinia homeocarpa* en plantas de *Festuca rubra* (Clarke *et al.*, 2006). La alelopatía asociada a compuestos producidos por plantas infectadas parece ser el mecanismo responsable del predominio de las plantas de *Lolium perenne*, en pastos en los cuales esta gramínea está mezclada con *Trifolium repens* (Watson *et al.*, 1993; Sutherland *et al.*, 1999).

En lo que respecta a las ventajas observadas en plantas infectadas ante la presencia de factores de estrés abiótico, algunas especies de *Festuca* tienen mayor tolerancia a la sequía (Bouton *et al.*, 1993), a la deficiencia de nutrientes en suelos (Malinowski y Belesky, 2000; Zabalgogezcoa *et al.*, 2006), o al exceso de aluminio (Liu *et al.*, 1996; Malinowski y Belesky, 1999) y de zinc (Monnet *et al.*, 2001).

La resistencia a herbívoros que presentan las plantas infectadas es debida a una serie de metabolitos secundarios de origen fúngico. Las gramíneas infectadas por hongos endofíticos producen cuatro tipos de alcaloides: ergopeptínicos, lolitrenos, lolina, y peramina. Los dos primeros están relacionados directamente con síndromes tóxicos en el ganado vacuno, ovino y equino (Gallagher *et al.*, 1984; Hill *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha descubierto que la peramina y la lolina tienen propiedades insecticidas, pero no son la causa de la toxicidad en mamíferos (Wilkinson *et al.*, 2000). El perfil de alcaloides que se pueden encontrar en estas asociaciones depende tanto de la especie del hongo y de la planta, como de factores ambientales (Lane *et al.*, 2000).

Las ventajas observadas en plantas infectadas frente a condiciones de estrés biótico y abiótico, contribuyen a aumentar la persistencia de las plantas infectadas. Buena evidencia del mutualismo existente entre gramíneas y hongos endofíticos, procede de estudios de campo en los cuales se ha observado que en mezclas de plantas infectadas y no infectadas de *F. arundinacea*, los niveles de infección aumentan con el tiempo, y finalmente las plantas infectadas llegan incluso a desplazar a especies nativas, modificando la composición botánica y la sucesión de los pastos (Shelby y Dalrymple, 1993; Clay y Holah, 1999; Rudgers *et al.*, 2007). Las elevadas tasas de infección endofítica, superiores al 70%, observadas en poblaciones naturales de *F. rubra* en acantilados marinos o en pastos semiáridos, sugieren que la presencia del hongo contribuye, de alguna manera, a aumentar la persistencia de la planta, dada la adversidad de algunos ecosistemas en los que crecen éstas (Zabalgogezcoa *et al.*, 2001; Arroyo *et al.*, 2002).

Los beneficios derivados de la asociación de *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* y *Festuca rubra* con especies de *Epichloë* y *Neotyphodium* han dado lugar a la utilización de los endofitos para la mejora de variedades comerciales de gramíneas destinadas a céspedes (Brilman, 2005).

1.2.3. Efectos perjudiciales de los endofitos en el ganado.

Como contrapartida a los efectos beneficiosos de la infección por *Epichloë*/ *Neotyphodium*, existe también un efecto negativo para la agricultura y la ganadería, y es la toxicidad para los animales que consumen plantas infectadas por estos hongos.

En países como Estados Unidos y Nueva Zelanda, donde la producción animal es dependiente de pastos constituidos por una o dos especies forrajeras, los problemas del ganado son importantes. Esto se debe a que la tasa de infección por *Neotyphodium* es muy elevada en variedades comerciales de *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne*, las principales especies forrajeras de esos países, en los cuales la implantación de variedades sin endofitos ha fracasado, debido a su mayor susceptibilidad al ataque de plagas y a la sequía. Sólo en los Estados Unidos, el impacto económico que supone la toxicidad de los pastos de *F. arundinacea* infectados por *Neotyphodium coenophialum*, ha sido estimado en

pérdidas de 400 millones de euros anuales en la producción de ganado vacuno de carne (Hoveland, 1993).

En Europa sólo se conocen casos puntuales de infecciones endofíticas, debido a que la producción animal depende menos de praderas artificiales de monocultivo, y en los pastos naturales, la riqueza de especies vegetales diluye el contenido de los alcaloides presentes en las especies infectadas. Aunque en algunas variedades forrajeras de *F. arundinacea* comercializadas en España se ha detectado la presencia de *N. coenophialum* (Zabalgogazcoa *et al.*, 1998), la mayoría de las variedades forrajeras comerciales de *L. perenne* o de *F. arundinacea* disponibles en Europa no están infectadas (Zabalgogazcoa y Bony, 2005).

Para solucionar el problema de la toxicidad de las plantas infectadas, varios grupos de investigación trabajan actualmente en la selección y el desarrollo de cepas de *Neotyphodium* no productoras de alcaloides de tipo ergot, que son los principales causantes de toxicosis en ganado. En Nueva Zelanda y Estados Unidos se han seleccionado variantes naturales de *Neotyphodium* que no producen alcaloides de tipo ergot. El rendimiento de las plantas infectadas es mejor que el de plantas libres de endofitos y, ya existen variedades comerciales infectadas por estos hongos (Bouton y Easton, 2005). Otro enfoque para solucionar el problema de la toxicosis en ganado, sin perder los beneficios causados por los endofitos, consiste en intentar modificar las rutas de biosíntesis de alcaloides tóxicos como los de tipo ergot y lolitrenos. Algunos grupos de investigación en Nueva Zelanda y Estados Unidos han avanzado bastante en este aspecto, desvelando las rutas de producción de estos alcaloides (Scott *et al.*, 1992; Panaccione y Schardl, 2003; Scott, 2007).

1.3. HONGOS ENDOFÍTICOS NO *Epichloë*.

Epichloë y *Neotyphodium*, los endofitos sistémicos de gramíneas, son actualmente los géneros mejor conocidos y más estudiados entre los hongos endofíticos. Sin embargo, este grupo sólo representa una pequeña parte de la enorme diversidad de especies endofíticas que se conocen hasta la fecha.

1.3.1. Abundancia y diversidad taxonómica.

Las asociaciones entre endofitos no sistémicos y plantas vienen marcadas por la ubicuidad. Hasta la fecha se han descubierto endofitos en todas las especies vegetales que han sido analizadas (Saikkonen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2004; Arnold, 2007) y en los ecosistemas más variados, desde bosques tropicales, a tundras y desiertos (Fisher *et al.*, 1995; Arnold *et al.*, 2000; Higgins *et al.*, 2006; Murali *et al.*, 2007; Porras-Alfaro *et al.*, 2008). Dicho de otra manera; en la actualidad, descubrir una especie vegetal sin endofitos se consideraría una rareza.

La diversidad taxonómica de los endofitos no sistémicos es notable. El número de especies endofíticas asociadas a cada especie vegetal es elevado; en censos de endofitos anteriores al año 2000, como media se identificaron unas 50 especies por cada especie de planta analizada (Stone *et al.*, 2004). Cuando se empezaron a utilizar métodos moleculares para la identificación de especies fúngicas este número aumentó debido a que las especies estériles pudieron ser clasificadas (Arnold *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000). Este avance ha supuesto que en algunos censos se hayan detectado cientos de especies endofíticas en una sola especie vegetal (Collado *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2000).

Los censos de especies endofíticas han mostrado la existencia de una gran diversidad taxonómica en este grupo de hongos, en el cual se encuentran especies pertenecientes a numerosos órdenes y géneros. Sin embargo, la mayoría de estos taxones pertenecen a la división Ascomycota (Stone *et al.*, 2004; Arnold, 2007). Esta diversidad también se ha observado al estudiar los endofitos asociados a una especie hospedadora en particular (Danti *et al.*, 2002; Higgins *et al.*, 2007; Duong *et al.*, 2006; Ganley y Newcombe, 2006; Morakotkarn *et al.*, 2006; Pinnoi *et al.*, 2006; Hata y Sone, 2008; Kharwar *et al.*, 2008).

A pesar de esta notable abundancia y variabilidad taxonómica, hay dos motivos por los cuales se debe pensar que la diversidad observada en muchos censos de endofitos es una infraestimación. En primer lugar, la mayoría de los censos realizados se han basado en especies cultivables en medios sintéticos, lo cual excluye a los biotrofos obligados. Algunos estudios han mostrado la existencia de endofitos de este tipo utilizando técnicas

basadas en la amplificación selectiva de DNA fúngico presente en tejido de planta (Duong *et al.*, 2006; Neubert *et al.*, 2006; Gallery *et al.*, 2007). En segundo lugar, las curvas de acumulación de especies que muestran como aumenta el número de especies fúngicas según aumenta el número de plantas analizadas han resultado ser no asintóticas en algunos censos bastante intensivos (Arnold *et al.*, 2000; Arnold y Lutzoni, 2007); ésto indica que existen más especies endofíticas de las que se han identificado en estos trabajos.

Dentro de una misma especie huésped, la composición de su micobiota endofítica varía dependiendo de factores geográficos como la distancia entre plantas (Collado *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2003; Gange *et al.*, 2007), o la estación del año (Collado *et al.*, 1999). Estos factores contribuyen a la notable diversidad observada en la micobiota endofítica.

1.3.2. Especificidad de tejidos.

Los endofitos no sistémicos se han encontrado en diversas partes de las plantas, como hojas, tallos, órganos reproductores e incluso semillas. Esto los distinguiría de las micorrizas, las cuales solo infectan la raíz de las plantas. Sin embargo algunos endofitos pueden también alojarse en tejidos de la raíz, por lo que en ocasiones la distinción *in vivo* no es firme.

En los estudios con hojas, que son los órganos en los que más se ha estudiado la presencia de endofitos (Arnold, 2007), las tasas de infección son elevadas, ya que entre el 78 y el 100% de las hojas analizadas contienen endofitos (Petrini *et al.*, 1982; Arnold *et al.*, 2000). Al estudiar la distribución de los endofitos en las hojas, se han obtenido estimaciones que indican que entre el 30 y el 73% de los fragmentos de cada hoja pueden estar colonizados por endofitos (Rodrigues, 1994, Arnold *et al.*, 2000).

En estudios realizados a finales del siglo pasado se vio que es habitual que haya diferencias entre la frecuencia de endofitos aislados de varios órganos de la planta (Fisher y Petrini, 1992; Rodrigues, 1994; Carroll, 1995).

Hasta la actualidad, muy pocos estudios hablan de una especificidad de los endofitos por el tejido. Se han visto casos de especificidad de ciertos endofitos por las raíces de las plantas (Jumpponen y Trappe, 1998; Mandyam y Jumpponen, 2005; Waller *et*

al., 2005; Porras-Alfaro *et al.*, 2008), y por las semillas (Gallery *et al.*, 2007). En trabajos sobre endofitos de hojas, no se puede afirmar que las especies aisladas muestren especificidad por este tejido, ya que no se han realizado los estudios pertinentes para saber si en otras partes de la planta podrían aislarse las mismas especies como endofitos. Lo que si se ha observado es que dentro de las hojas puede existir especificidad por la zona donde se alojan dichos hongos, ya que se ha visto que una especie desconocida de *Phomopsis* se aloja únicamente en el raquis de las hojas de *Spondias mombin* (Rodrigues y Samuels, 1999), y en plantas de la especie *Neolitsea sericea* se han aislado unas especies de la hoja y otras especies diferentes del peciolo (Hata y Sone, 2008). En otro estudio se ha encontrado especificidad de endofitos por las agujas de los abetos de Noruega (Müller *et al.*, 2001).

Un fenómeno común tanto para zonas tropicales como templadas, es el de la especificidad del endosimbionte por algún tejido vegetal en particular. Así, se ha visto que los hongos xilariáceos tienen preferencia por los tejidos vegetales aéreos en árboles tropicales (Laessøe y Lodge, 1994; Lodge *et al.*, 1996). Sin embargo, esta preferencia de los endosimbiontes no se observó en un estudio realizado en Puerto Rico sobre orquídeas epífitas del género *Lepanthes*, en el que no se encontraron diferencias significativas entre los endofitos de las raíces y hojas (Bayman *et al.*, 1997)

El ejemplo más importante de la especificidad de los endofitos por el tejido es el de los endofitos radicales septados oscuros (DSE, del inglés dark septate endophytes), que son un grupo diverso de Ascomycetes anamorfos que colonizan los tejidos intra e intercelulares de las raíces de las plantas. Jumpponen y Trappe (1998) los definen como Ascomycetes conidiales o estériles que colonizan la raíz de plantas vivas sin causar, aparentemente, efectos negativos como la desorganización de los tejidos. Ahora se sabe que los DSE son tan abundantes en la naturaleza como las micorrizas, debido a que son capaces de colonizar un gran número de plantas en el ecosistema en que se desarrollan, además de por la extensa colonización que sufren las raíces de las plantas colonizadas.

1.3.3. Especificidad por el hospedador.

En varios estudios se ha demostrado como algunas especies de endofitos pueden llegar a colonizar a diversos hospedadores (Arnold y Lutzoni, 2007). En realidad, aparte de casos como *Epichloë*, no se conocen muchos ejemplos de especificidad hacia el hospedador por parte de los endofitos.

Otro ejemplo es un estudio realizado sobre endofitos de 24 especies distintas de plantas, que incluyen 11 familias, entre ellas las gramíneas, en el cual se observó que 3 especies de *Fusarium* tenían preferencia por el hospedador, más que por la localidad o por el hábitat en que crecían las plantas (Maciá-Vicente *et al.*, 2008).

Sin embargo, lo que si parece claro es que algunas de las especies más comunes aisladas como endofitos son generalistas, capaces de infectar a numerosos huéspedes. El rango de hospedadores de algunos hongos endofíticos es tan amplio que es posible que hongos de una misma especie colonicen especies de plantas distintas relativamente lejanas. Esto implica que un endofito responsable de conferir tolerancia al estrés en una especie de plantas podría ser usado para colonizar a hospedadores asintomáticos, y conferir beneficios similares. Endofitos como *Alternaria*, *Penicillium* o *Piriformospora*, poseen un alto rango de hospedadores (Stone *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005).

Un último ejemplo son los DSE, que generalmente se encuentran asociados con coníferas, principalmente Ericales, aunque también se han aislado como endofitos de gramíneas.

1.3.4. Transmisión.

La transmisión de endofitos puede ser horizontal, cuando el inóculo entra en contacto con una planta y la infecta, o vertical, cuando la planta infectada produce semillas también infectadas. Aunque hay casos como *Epichloë* y *Neotyphodium* cuya transmisión es vertical, la transmisión horizontal parece ser el mecanismo predominante en los hongos endofíticos. Algunos estudios han mostrado que las semillas y las plántulas están

virtualmente libres de endofitos, y la incidencia de éstos se incrementa cuando las hojas o las semillas envejecen (Arnold *et al.* 2003; Gallery *et al.* 2007). Esto implica la existencia de un inóculo externo a la planta que entra en contacto con ella y la infecta.

En vista de que los endofitos no suelen inducir síntomas a sus huéspedes, queda la incertidumbre sobre donde se puede producir el inóculo endofítico, ya que la producción de inóculo fúngico suele estar a veces asociada a la formación de lesiones y estructuras a menudo macroscópicas en plantas. Los endofitos que se comportan como saprofitos latentes, podrían producir el inóculo tras la muerte de su hospedador. En estos casos, la hojarasca y otros restos vegetales podrían ser un foco de inóculo de endofitos (Bills y Polishook, 1994). En plantas vivas se conocen situaciones en las cuales se producen conidios de manera imperceptible en la superficie foliar (Tadych *et al.*, 2007). Por último, algunos insectos podrían jugar un papel importante en la dispersión del inóculo endofítico, al ser las esporas de algunas especies resistentes al paso por su aparato digestivo (Devarajan y Suryanarayanan, 2006).

1.3.5. Tipos de interacción planta-hongo endofítico.

Dentro de la gran variedad de especies de hongos que se comportan como endofitos, es posible hacer algunas agrupaciones según la naturaleza de la interacción simbiótica que mantienen con sus huéspedes.

Algunas especies identificadas en censos de endofitos son **patógenos latentes**. El estado de latencia se define como el periodo en el cual una planta está infectada por un patógeno pero no muestra síntomas (Agrios, 2005). Esta definición se refiere a una situación en la cual los síntomas van a aparecer más tarde. Por lo tanto, al recolectar tejido asintomático para determinar la presencia de endofitos es posible que este tejido esté infectado por patógenos latentes. En algunos trabajos se han reinoculado artificialmente endofitos, y como resultado se han observado síntomas de enfermedad (Photita *et al.*, 2004), o se ha comprobado que ciertas especies endofíticas eran conocidas como patógenos en su huésped (Mostert *et al.*, 2000).

En otros casos, un hongo puede actuar como **patógeno en unas plantas y como endofito en otras plantas de la misma especie**. *Fusarium moniliforme* causa pudrición de granos, raíces, tallos y plántulas de maíz, además de producir cinco tipos de toxinas implicadas en la producción de cáncer de esófago en Suráfrica (Rheeder *et al.*, 1992; Bacon y Hinton, 1996). Existe evidencia de que *F. moniliforme* puede ser más común como endofito que como patógeno en zonas templadas y tropicales. Como ejemplo, en un estudio realizado en zonas templadas, se aisló *Fusarium* de todos los órganos del total de plantas muestreadas (Kedera *et al.*, 1994). Así mismo, en un estudio realizado en Nigeria, de la mayoría de los granos y plántulas asintomáticas de maíz se aisló *F. moniliforme* como endofito (Thomas y Buddenhagen, 1980). En las infecciones asintomáticas en maíz, las hifas crecen intercelularmente, mientras que en las patogénicas el crecimiento es además intracelular (Bacon y Hinton, 1996). Dado que hay crecimiento activo del hongo, puede existir además producción de micotoxinas; ésto sugiere que puede producirse contaminación por estas toxinas en el maíz y sus derivados sin que haya evidencia de infección fúngica. Estas situaciones pueden ser interpretadas, al menos, de dos maneras: el genotipo de la planta influye en la conducta del hongo, o también podría ser el genotipo del hongo el que dicte su tipo de interacción con la planta. Un ejemplo del último supuesto es un estudio en el que se demostró que la diferencia genotípica entre un hongo patógeno y un endofito puede ser mínima, identificándose un mutante en un solo locus de un aislado patógeno de *Colletotrichum magna* que se comportaba como endofito (Freeman y Rodríguez, 1993).

También se han observado situaciones en las que un hongo actúa como **patógeno en unas especies de plantas y como endofito en otras especies**. Esto se ha comprobado con varias especies de *Colletotrichum* que son patógenos de una especie pero pueden infectar asintomáticamente otras especies de plantas (Redman *et al.*, 2001). En este estudio también se observaron situaciones en las que algunos aislados de *Colletotrichum* podían comportarse como endofitos en una variedad y no ser capaces de infectar otras variedades de la misma especie hospedadora.

Otras especies endofíticas se comportan como **saprofitos latentes**, es decir, hongos que infectan asintomáticamente a la planta y que cuando ésta senesce o muere colonizan

sus tejidos, pudiendo llegar a formar estructuras reproductivas y completar su ciclo de vida (Promputtha *et al.*, 2007).

Por último, existen interacciones en las cuales **el endofito se comporta como un simbiote mutualista**. Este tipo de interacciones son bien conocidas en el caso de los endofitos *Epichloë* y *Neotyphodium*. En el caso de otras especies endofíticas, aunque no han sido estudiadas tan a fondo, también abundan los ejemplos. El desentrañar si una simbiosis con un hongo endofítico es de tipo mutualista o no puede ser una tarea laboriosa, ya que por definición las plantas infectadas no muestran síntomas. No obstante se han descubierto bastantes situaciones en las cuales, bajo la influencia de factores de estrés biótico o abiótico, las interacciones con endofitos son beneficiosas para las plantas. Esta evidencia, que parece ir en aumento, de la naturaleza mutualista de bastantes asociaciones de plantas con endofitos, ha llevado a algunos autores a postular que las interacciones con estos hongos son muy importantes para la adaptación y supervivencia de las plantas (Rodríguez y Redman, 2008). Debido al interés de este tipo de interacciones, se discuten en una sección aparte.

1.3.6. Interacciones mutualistas.

Se conocen varios casos de ventajas conferidas por endofitos a plantas en condiciones de estrés causado por **factores abióticos**. Uno de los más interesantes es el caso de la gramínea *Dichantelium lanuginosum* que crece cerca de fuentes termales, en suelos que llegan a alcanzar temperaturas de 50°C. Las plantas crecen en estos lugares gracias a su asociación con el hongo *Curvularia protuberata*, un endofito de la raíz. Este endofito ha sido inoculado en plantas de tomate, confiriéndolas termotolerancia (Redman *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2007). Otro caso es el de algunos aislados endofíticos de *Colletotrichum magna* que producen un aumento de la supervivencia de plantas de sandía en condiciones de estrés hídrico (Redman *et al.*, 2001). Con respecto a la salinidad, *Piriformospora indica*, un basidiomycete endofítico que infecta a raíces de varias especies de plantas, aumenta la tolerancia a la salinidad en plantas de cebada (Waller *et al.*, 2005).

También se han observado casos en los cuales la asociación con endofitos está relacionada con un aumento de la resistencia de las plantas a **factores de estrés biótico** tales como herbívoros o patógenos (Zabalgogezcoa, 2008). Algunas especies entomopatógenas como *Cordyceps bassiana* o *Torrubiella confragosa*, pueden colonizar como endofitos diversas especies de plantas (Bills, 1996; Quesada Moraga *et al.*, 2006; Zabalgogezcoa *et al.*, 2008b), algo que también se ha observado con hongos nematófagos (Bordallo *et al.*, 2002). La presencia de este tipo de hongos podría alterar las poblaciones de herbívoros cercanas a plantas infectadas y existe un interés en la utilización de este tipo de endofitos como agentes de control biológico.

El aumento de la resistencia a nematodos y hongos en plantas infectadas por endofitos puede atribuirse a tres mecanismos: inducción de los mecanismos de defensa por parte del endofito, producción de sustancias antibióticas que inhiben a patógenos, o competición con otros organismos por el espacio o los nutrientes de la planta.

Piriformospora indica, parece inducir mecanismos de defensa en plantas de cebada. En las plantas infectadas por este endofito hay una respuesta de defensa con muerte celular localizada cuando las plantas son atacadas por *Fusarium culmorum* o por *Blumeria graminis* (Waller *et al.*, 2005). Un mutante endofítico no patógeno de *Colletotrichum magna* protege a plantas de sandía frente a aislados patógenos de *Colletotrichum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* y *Phytophthora capsici* (Freeman y Rodriguez, 1993; Redman *et al.*, 2001), aunque el nivel de protección observado no era total, como se podría esperar de una inducción sistémica de resistencia, los autores de este trabajo sugieren que este endofito podría causar una inducción, al menos parcial, de los mecanismos de defensa en la planta.

Son relativamente comunes los ejemplos de endofitos productores de sustancias antibióticas (Liu *et al.*, 2001; Strobel, 2002; Schulz y Boyle, 2005; Park *et al.*, 2005; Inácio *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Si estos compuestos fuesen producidos *in planta*, podrían constituir un mecanismo de defensa contra hongos patógenos. Endofitos de los géneros *Chaetomium* y *Phoma* protegen al trigo frente a la roya de las hojas, ya que las lesiones son de menor tamaño en plantas infectadas por estos endofitos, y lo mismo sucede si las plantas son rociadas con extractos líquidos de cultivos de endofitos (Dingle y

McGee, 2003; Istifadah y McGee, 2006). En este caso, los endofitos podrían producir sustancias que inhiben a los patógenos, aunque también estas sustancias podrían inducir mecanismos de defensa en la planta. Algunas especies endofíticas de *Fusarium* producen un aumento de la resistencia a nematodos en plantas. Aunque se ha observado que los extractos líquidos de cultivos de aislados endofíticos de *F. oxysporum* inhiben a *Meloidogyne incognita* (Hallmann y Sikora, 1996), el mecanismo de protección podría ser más complejo que la simple producción de sustancias tóxicas, ya que en experimentos con plantas de banano con raíces divididas, la resistencia al nematodo *Radopholus similis* se observó también en la mitad de raíz no inoculada con el endofito (Vu *et al.*, 2006).

La inoculación de plantas de cacao (*Theobroma cacao*) con una mezcla de seis especies endofíticas comúnmente asociadas a la planta, produjo una reducción del tamaño de las lesiones causadas por *Phytophthora* sp. (Arnold *et al.*, 2003). En este estudio se observaron diferencias en el tamaño de las lesiones entre hojas inoculadas y no inoculadas por endofitos en la misma planta, por lo tanto, el mecanismo de protección no parece estar basado en la inducción sistémica de defensas de la planta, sino que podría estar relacionado con la competición entre endofitos y patógenos por el espacio y los nutrientes.

Otro tipo de competición directa entre endofitos y patógenos puede darse si un endófito tiene la capacidad de parasitar otros hongos. Este es el caso de *Acremonium strictum*, un endofito relativamente común en varias especies de plantas, que es un parásito del patógeno de la patata *Helminthosporium solani* (Rivera-Varas *et al.*, 2007).

1.4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS HONGOS ENDOFÍTICOS.

La primera motivación extra académica que dio un impulso a la investigación sobre endofitos fue la toxicosis del ganado alimentado por pastos de *Festuca* o *Lolium* infectados por *Neotyphodium lolii* y *N. coenophialum*. Las importantes pérdidas económicas causadas por estos hongos en Estados Unidos y Nueva Zelanda dieron lugar a un avance importante en el conocimiento de estos organismos y aportaron soluciones al problema de la toxicidad. En la actualidad, el manejo de la toxicidad de endofitos del género *Neotyphodium* está dirigido a evitar los daños en el ganado, a la vez que sirve para aprovechar las ventajas de

la asociación endofítica para las plantas. Una derivación de la investigación sobre la toxicidad en variedades forrajeras ha sido la explotación de las ventajas adaptativas aportadas por endofitos de *Epichloë/Neotyphodium* en gramíneas utilizadas en céspedes (Zabalgogazcoa y Vázquez de Aldana, 2007).

Desde el punto de vista de la Fitopatología, hay varios motivos que justifican el interés por los endofitos. Estos hongos se asemejan a los patógenos en varios procesos del ciclo de la enfermedad (Agrios, 2005). Los endofitos pueden llevar a cabo los procesos de penetración, infección, y en algunos casos de invasión de la planta; sin embargo, ni causan enfermedad, ni son eliminados por una respuesta de defensa del huésped. De ahí que surjan cuestiones como, ¿Por qué algunos hongos causan enfermedades y otros no?. ¿Cómo puede un hongo evadir las defensas inducibles de una planta?. Este tipo de preguntas son el resultado del conocimiento sobre endofitos y pueden derivar en hipótesis para estudiar los mecanismos de patogenicidad o de evolución de la virulencia.

A juzgar por los resultados obtenidos en censos de endofitos, es posible que la mayoría de las especies que infectan a una especie vegetal no sean patógenas, sino endofitas. Sin embargo, ya hemos visto que un hongo que se comporta como endofito en una especie puede ser un patógeno en un huésped de otra especie (Redman *et al.*, 2001). Estas observaciones hacen pensar que lo que se considera un “*patógeno especializado*”, porque sólo causa enfermedad en una especie, sea posiblemente un endofito en otras especies. También nos remontan a casos de parásitos animales, como algunos virus de simios (ej. Simian Herpes virus B, tal vez VIH) que son endémicos e incluso asintomáticos en sus huéspedes, pero al cambiar de especie e infectar humanos tienen un efecto letal (Nsabimana *et al.*, 2008).

Dada la ubicuidad de los endofitos en los tejidos vegetales, es muy posible que al infectar plantas los patógenos tengan que interactuar con los endofitos. En algunos casos estos endofitos pueden alterar el curso de las enfermedades, lo que sugiere que el grupo de los hongos endofíticos alberga especies potencialmente útiles como agentes de control biológico; de ahí que tengan potencial como agentes de control biológico, contra enfermedades y plagas de plantas, e incluso de animales (Backman y Sikora, 2008; Zabalgogazcoa, 2008; Zabalgogazcoa *et al.*, 2008b).

Algunas especies endofíticas producen una mejora de la tolerancia a factores de estrés abiótico tales como sequía, altas temperaturas, o excesos o deficiencias de algunos nutrientes en el suelo. Este otro aspecto sugiere que existen endofitos que pueden ser utilizados para la mejora de plantas.

Los endofitos también constituyen una fuente importante de sustancias de interés farmacológico (Strobel, 2002). Es posible que la producción de sustancias antibióticas ayude a estos hongos a preservar su nicho ante otros competidores. Un claro ejemplo de este tipo de sustancias es el taxol, que es un diterpenoide muy eficaz como fungicida y como agente antitumoral, el cual es producido en la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, y también por uno de sus hongos endofíticos, *Taxomyces andreae* (Stierle *et al.*, 1993). Otro ejemplo son los hongos de la familia *Xylariaceae*, una de las más comunes en los endofitos de zonas tropicales, los cuales producen abundantes sustancias bioactivas como son las citocalasinas y griseofulvinas (Whalley y Edwards, 1987). Buena evidencia del interés de los hongos endofíticos para la industria farmacéutica es que este trabajo ha sido financiado por Merck, Sharp & Dohme; extractos de todos los aislados descritos en ella han sido analizados para comprobar si poseían actividad antifúngica y antibacteriana.

Otra utilidad de los endofitos puede ser en la industria del petróleo, ya que es una de las principales contaminantes del medioambiente, y desde hace años se investiga el posible uso de los microorganismos para degradar esos contaminantes a metabolitos menos tóxicos y persistentes, en el proceso conocido como biorremediación (Atlas y Cerniglia, 1995). En la zona templada se han realizado varios ensayos para detectar hongos biorremediadores, como las especies *Phanerochaete laevis* y *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* (Bogan y Lamar, 1996; Bayman y Bennett, 2004). En los trópicos, estos estudios han sido poco abordados, pero los pocos datos existentes muestran un buen potencial de las especies de esta zona. Se han aislado dos hongos endofíticos (uno de ellos perteneciente al género *Xylaria*) de algas marinas tropicales, que han mostrado actividad en la descomposición de hidrocarburos como el fenantreno (Acevedo, comunicación personal).

Finalmente, si tal como se ha estimado, hoy en día se conocen menos del 10% de las especies de hongos que podrían existir (Hawksworth, 2001), es muy posible que el

estudio de los hongos endofíticos que habitan en los ecosistemas conlleve al descubrimiento de nuevas especies de hongos.

1.5. TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS.

Debido a los efectos beneficiosos y perjudiciales, al interés suscitado y a la relevancia adquirida por los hongos endofíticos, la biología molecular ha tomado un papel esencial para los investigadores, ya que diversas técnicas han permitido un mejor estudio y clasificación de los hongos endofíticos.

Es común que al aislar endofitos un número considerable de cepas sean estériles, lo cual dificulta su identificación, al carecer de las características taxonómicas necesarias. En algunos casos los aislados estériles son agrupados en ‘morfotaxones’ o ‘morfoespecies’, en base a las características macroscópicas de los cultivos tales como color, tasa de crecimiento o aspecto del micelio (Polishook *et al.*, 1996; Umali *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2000; Fröhlich *et al.*, 2000) y son usados frecuentemente como unidades taxonómicas funcionales (Guo *et al.*, 2000, 2003; Arnold *et al.*, 2003).

Esta dificultad para identificar cultivos estériles es común en estudios de endofitos anteriores al siglo XXI (Petrini *et al.*, 1982; Espinosa-García y Langenheim, 1990; Johnson y Whitney, 1992; Fisher *et al.*, 1993, 1994, 1995; Taylor *et al.*, 1999). Las técnicas moleculares representan una solución para resolver problemas en taxonomía de hongos (Takamtsu, 1998; Ranghoo *et al.*, 1999), y en varios estudios han sido usadas para la identificación de hongos (Rollo *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). A principios del siglo XXI, los datos de secuencias moleculares del RNA ribosómico han sido usados para identificar cultivos estériles y evaluar límites de morfotaxones (Collado *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000).

A finales del siglo XX, es cuando se empezaron a aplicar técnicas moleculares al estudio de las plantas (Hamby y Zimmer, 1988; Hamby *et al.*, 1988; Bousquet *et al.*, 1990; Bruns *et al.*, 1990) y de los hongos (O'Donnell, 1992; Simon *et al.*, 1992; Kiss y Nakasone,

1998), siendo posteriormente aplicadas al estudio de los hongos endofíticos (Sharples *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2001).

En los últimos años, diversos trabajos en los que se han utilizado métodos basados en el DNA, han permitido aislar o identificar una diversa población endofítica compuesta por hongos de partes asintomáticas de las planta (Redling y Carris, 1996; Saikkonen *et al.*, 1998; Girlanda *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003).

El estudio de las secuencias de DNA ribosómico ha proporcionado información útil acerca de algunos grupos de Ascomycetes y Basidiomycetes, en particular sobre relaciones evolutivas y de especiación, junto con la biogeografía. Dentro del *locus* DNAr, la región del espaciador interno transcrito (ITS, del inglés internal transcribed spacer) ha sido particularmente útil en el análisis de especies cercanas en muchos géneros (Zervakis *et al.*, 2004). El operón rrn (Figura 6) está representado por una o varias copias en cada organismo. Este complejo tiene varios dominios que están involucrados en diversas funciones (Jorgensen y Cluster, 1988) y además tienen diferentes utilidades para análisis filogenéticos. Los genes 18S y 28S RNAr han variado poco a lo largo de la evolución, por lo que son estables y de gran utilidad en el encauzamiento de hipótesis filogenéticas que involucran a un amplio rango de organismos (Bruns *et al.*, 1990; Cullings, 1994; Maidak *et al.*, 1997). Por otro lado, los ITS son zonas que evolucionan rápidamente y sus secuencias pueden variar entre especies, por lo que pueden ser usados para determinaciones interespecíficas (Jorgensen y Cluster, 1988; Cullings *et al.*, 1996; Vogler y Bruns, 1998), y a veces en estudios de relaciones intraespecíficas (Baura *et al.*, 1992). El espaciador intergénico (IGS, del inglés intergenic spacer), una región no codificante, es susceptible de ser utilizada para el estudio de poblaciones (Jorgensen y Cluster, 1988; Appel y Gordon, 1996).

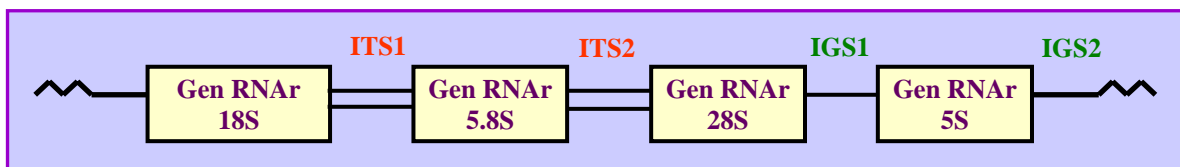


Figura 6. Estructura del operón rrn. ITS: región espaciadora interna transcrita. IGS: espaciador intergénico.

Entre los dos ITS, ITS1 e ITS2, se encuentra ubicado el gen 5.8S RNAr. Este gen, al igual que el 18S y el 28S sufre una evolución relativamente lenta, pero el hecho de que esté localizado dentro del ITS hace que sea utilizado generalmente como una herramienta taxonómica, ya que habitualmente se utiliza junto con las regiones ITS. Además, un punto que apoya la utilización de esta región es que contiene una información filogenética considerable, particularmente con respecto a la profundidad de las ramas basales (Hershkovitz y Lewis, 1996).

Sin embargo, actualmente la abundancia y el fácil acceso a las secuencias de la zona ITS de hongos que se encuentran depositadas en las bases de datos públicas, como la base de datos GenBank que contenía 21.075 secuencias de ITS de hongos a principios de 2004 (Lutzoni *et al.*, 2004), así como la información que aporta esta región y el constante aporte de nuevas secuencias por parte de muchos investigadores, hace que sea la más indicada en la actualidad para la identificación de especies y estudios de diversidad de hongos endofíticos.

1.6. LAS GRAMÍNEAS.

Este trabajo está centrado en el estudio de los hongos endofíticos no pertenecientes a los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium*, asociados a cuatro especies de gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Ammophila arenaria*, *Elymus farctus* y *Holcus lanatus*. Por lo tanto, al ser hongos aislados de una de las familias de plantas más importantes, vamos a describir brevemente las características más relevantes de este grupo.

Las **gramíneas** (División: *Magnoliophyta*, clase: *Liliopsida*, subclase: *Commelinidae*, orden: *Poales*, familia *Poaceae*) son plantas herbáceas, perennes o anuales. Son la cuarta familia con mayor riqueza de especies, con más de 670 géneros y cerca de 10.000 especies descritas, tras las compuestas (*Asteraceae*), las orquídeas (*Orchidaceae*) y las leguminosas (*Fabaceae*), pero es la primera en importancia económica mundial (Judd *et al.*, 2002), ya que la mayor parte de la dieta de los seres humanos proviene de las gramíneas, tanto en forma directa (granos de cereales, harinas y aceites), como indirecta

(carne, leche y huevos que provienen del ganado y las aves que se alimentan de los pastos o granos).

1.6.1. Características generales.

Las gramíneas son plantas que presentan una estructura vegetativa bastante uniforme (Figura 7). Las raíces principales suelen ser fibrosas; las secundarias o adventicias brotan en muchos casos de los nudos de los tallos, como sucede en el maíz.

Los tallos son generalmente herbáceos (en gramíneas de césped) o huecos (en el bambú), aunque hay excepciones, como los tallos medulares del maíz y los leñosos de algunos bambúes.

Las hojas, que nacen en los nudos de los tallos, constan de dos partes: vaina y limbo. La vaina envuelve el peciolo y sujeta la zona formada por un tejido de crecimiento blando llamado meristemo. El tallo de las gramíneas no crece en longitud por el ápice, como en casi todas las demás plantas, sino en cada uno de los nudos.

Otra característica distintiva de las gramíneas es la lígula, una breve prolongación membranosa, pubescente o pilosa, que se inserta en el punto de unión de la vaina y el limbo foliares. Su función es desconocida, pero se cree que sirve para evitar que la humedad penetre en la zona comprendida entre el tallo y la vaina. No todas las gramíneas tienen lígula.

El limbo foliar es largo y estrecho, con nervios paralelos, aunque presenta grandes variaciones de forma y tamaño. El crecimiento se produce en su área meristemática, situada en la base, por encima de la unión con la vaina, y no en el ápice, al contrario de lo común en casi todas las demás plantas. Por tanto, incluso si se corta el extremo superior de la hoja, el limbo puede continuar creciendo. Esta peculiaridad, combinada con la presencia de tejido meristemático en los nudos de los tallos y el hecho de que las gramíneas se ramifiquen cerca del suelo, permite a estas plantas soportar los rigores de muchos medios naturales y artificiales inaccesibles a otras especies vegetales.

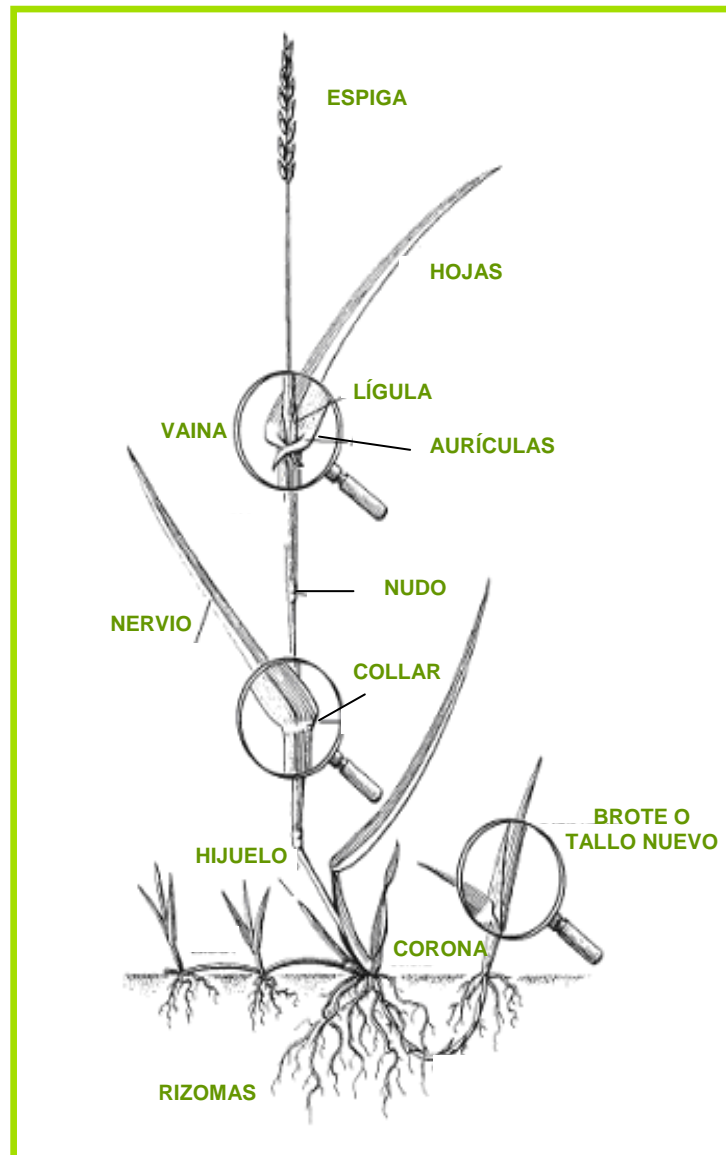


Figura 7. Estructura de una gramínea.

Las flores suelen ser inconspicuas, pero casi siempre se agrupan en grandes inflorescencias, a veces vistosas, como en el maíz. Casi todas las gramíneas son de polinización anemófila, y por ello tienen flores muy sencillas y reducidas. Las flores individuales de las gramíneas se llaman flósculos. Carecen de sépalos y pétalos. El ovario único es súpero (situado por encima de las otras estructuras florales) y está rematado por dos estigmas plumosos. Al madurar, el ovario se transforma en un fruto peculiar de una sola semilla llamado cariósido, caracterizado por la fusión de la semilla y la pared del ovario. Ninguna poácea tiene nectarios, si bien la polinización por insectos se conoce en

algunos pastos de bosques, especialmente en pequeñas bambusoideas (Soderstrom y Calderón, 1971).

La dispersión de las semillas se produce principalmente por animales; si unas pocas gramíneas tienen frutos verdaderos (una excepción es *Alvimia*, una bambusoidea) puede haber otras estructuras que atraigan a los animales, como los elaiosomas (Davidse, 1987), así como ganchos y agujas mediante los cuales las diásporas se fijan a los animales (ej. *Centotheca*). Las semillas, en gran número de especies, son dispersadas por el viento, por ejemplo, por tener largos pelos en las aristas, mientras que *Spinifex* y otros géneros son plantas rodantes. Las aristas pueden ayudar en la dispersión de las semillas por viento y por animales.

Los flósculos de las gramíneas están agrupados en unidades llamadas espículas o espiguillas. Cada espiguilla consta de un eje o raquis a lo largo del cual se disponen los flósculos. Cada uno está encerrado por una bráctea externa llamada lema y otra interna llamada pálea. En la base del raquis hay dos brácteas llamadas glumas que están vacías. Las glumas y lemas suelen ser duras, y con frecuencia se prolongan en una púa; la pálea es delicada y membranosa.

1.6.2. Distribución.

Las gramíneas son plantas de gran importancia ecológica, debido a su relevancia biológica, pues se calcula que ocupan el 20% de la superficie vegetal del mundo. Es una familia que ha sido capaz de conquistar la mayoría de los nichos ecológicos de la Tierra, desde zonas desérticas hasta ecosistemas marinos, de zonas situadas por encima del círculo polar ártico hasta la Antártida, pasando por las regiones templadas y los trópicos. Su capacidad adaptativa se debe a la enorme diversidad morfológica, fisiológica y reproductiva de sus especies. Abundan sobre todo en hábitats abiertos, y en parajes como la sabana, las praderas y las estepas tienden a dominar, llegando incluso a constituir bandas de vegetación muy extendidas que confieren una fisionomía propia al territorio; pero también hay muchas especies forestales, sobre todo en los trópicos. Algunas están

adaptadas a hábitats de aguas saladas y dulces, aguas estancadas y corrientes; otras flotan en la superficie del agua y no están unidas al suelo.

Algunas de las especies de gramíneas silvestres más comunes en España son: *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense* y *Poa pratensis*, todas ellas fácilmente identificables en cunetas, prados, herbazales, etc.

1.6.3. Importancia económica.

El cultivo de cereales es la base del desarrollo de las primeras sociedades civilizadas tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. Entre los cereales más importantes están el trigo, con las 2 especies fundamentales, el de grano duro (*Triticum durum*) y el de grano blando (*Triticum aestivum*), la cebada (*Hordeum vulgare*), la avena (*Avena sativa*), el centeno (*Secale cereale*), el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays*), ampliamente cultivados en las regiones templadas (Figuras 8A-G). En las regiones tropicales de África y de Asia oriental, además del arroz, está bastante difundido el mijo, cereal con gran aporte energético, cuyas principales especies por importancia económica son *Pennisetum glaucum* (Figura 8H), *Setaria italica*, *Panicum miliaceum*, *Eleusine coracana* y *Panicum virgatum*.

Además, la familia *Poaceae* aporta casi todo el azúcar del mundo, extraído del culmo de la caña de azúcar, *Saccharum officinarum* (Figura 9A), ampliamente cultivado en las regiones tropicales. Otra planta de la familia, el bambú (Figura 9B), sirve como material de construcción y fuente de alimento, además de usarse también en la fabricación de papel. La citronela, un aceite ligeramente dulce y alimonado usado en perfumería y utilizado como repelente de insectos, es una esencia destilada de las hojas de las especies *Cymbopogon nardus* (Figura 9C) y *Cymbopogon winterianus*.

También las gramíneas son la principal fuente de alimentación de los animales herbívoros domésticos y salvajes, que pastan en praderas, sobre todo algunas especies forrajeras pertenecientes a los géneros *Anthoxanthum*, *Festuca*, *Lolium* y *Poa*, las cuales crecen en zonas templadas de Europa.

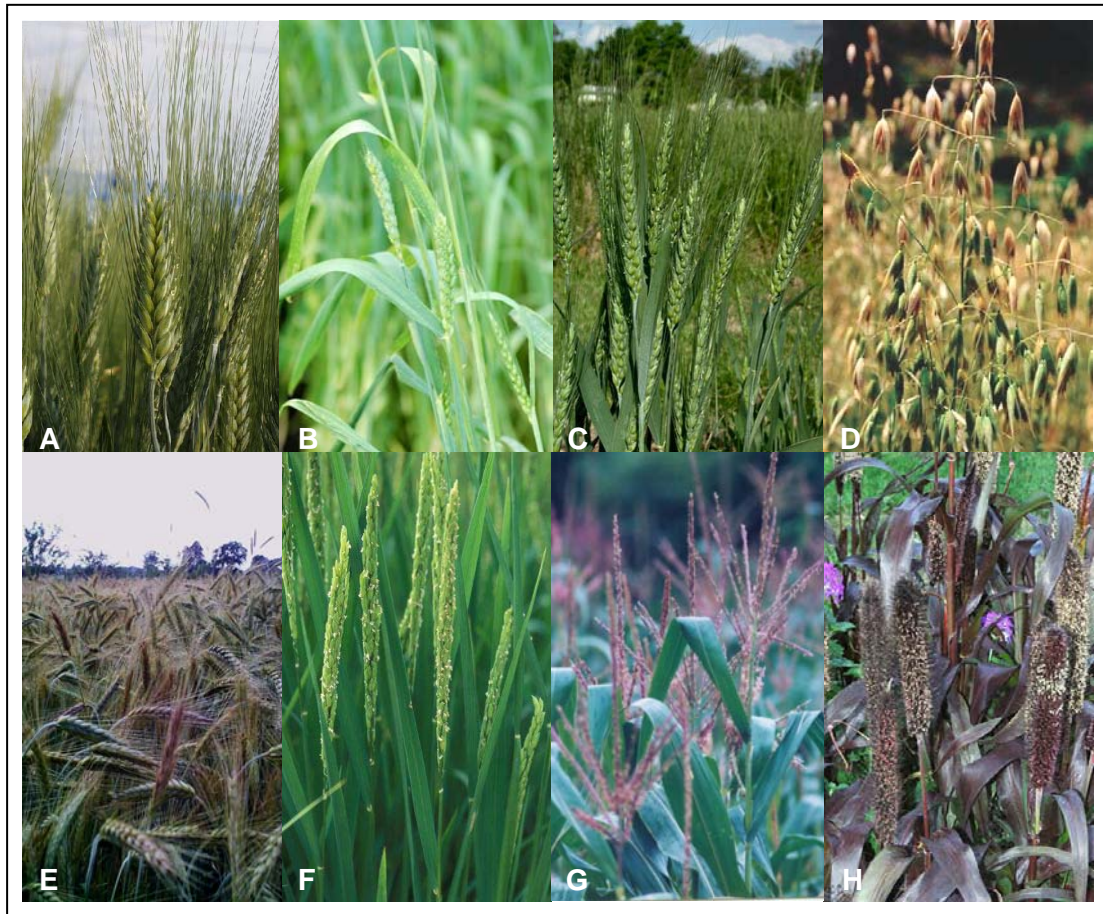


Figura 8. Principales cereales cultivados a nivel mundial. **A.** Trigo de grano duro (*Triticum durum*). **B.** Trigo de grano blando (*Triticum aestivum*). **C.** Cebada (*Hordeum vulgare*). **D.** Avena (*Avena sativa*). **E.** Centeno (*Secale cereale*). **F.** Arroz (*Oryza sativa*). **G.** Maíz (*Zea mays*). **H.** Mijo (*Pennisetum glaucum*).

Otra aplicación de las gramíneas de considerable importancia económica en muchas partes del mundo es la plantación de los céspedes ornamentales y deportivos.

Pero no todas las gramíneas son beneficiosas; algunas se consideran malas hierbas, ya que invaden los cultivos y reducen el rendimiento global, pues compiten con la especie cultivada, dificultando la recolección o reduciendo el valor nutritivo del producto. Además, algunas gramíneas tropicales forrajeras producen en determinadas condiciones concentraciones mortales de ácido cianhídrico.



Figura 9. Otros cultivos económicamente importantes de gramíneas. **A.** Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). **B.** Bambú dorado (*Phyllostachys aurea*). **C.** Citronella (*Cymbopogon nardus*).

1.6.4. Especies de gramíneas analizadas.

Nuestro estudio se centra en 4 especies de gramíneas adaptadas a diferentes hábitats:

- *Dactylis glomerata*
- *Holcus lanatus*
- *Ammophila arenaria*
- *Elymus farctus*

1.6.4.1. *Dactylis glomerata*.

Es una gramínea perenne, nativa de Europa, del Oeste de Asia y del Norte de África. Su distribución es cosmopolita, naturalizada en toda América templada y en Oceanía, tanto que en determinadas áreas es una especie invasora. Habita desde zonas de altitud baja hasta niveles alpinos, en un amplio rango climático. En la zona central de España esta especie es común en pastos semiáridos y otras zonas donde escasea el agua.

Esta capacidad de adaptación a la sequía contrasta con las otras especies de gramíneas que han sido estudiadas en esta tesis.

Es una planta robusta y cespitosa con tallos erectos de 15 a 140 cm de altura, y comprimidos en la base. Sus hojas son lampiñas, verdes o algo glaucas, y vainas aquilladas. Posee inflorescencias en panículas rígidas, desparramadas o densas, erectas, con ramas basales sin espiguillas en una gran área (Figura 10A).

Su nombre fue derivado de la forma de su inflorescencia (Figura 10B), ya que la palabra griega *dactulos*, que significa dedo, y hace referencia a las ramificaciones de la inflorescencia. Se reproduce sexualmente por semilla y asexualmente a través de material vegetativo. Florece de mayo a septiembre (Hubbard, 1984).



Figura 10. A. Características morfológicas de *Dactylis glomerata*. CE y CH: semillas; F y L: lemas; FL: anteras; G1 y G2: glumas; LI: lígula; LO: lodícula; P: pálea. S: espiguilla; (Hubbard, 1984). **B.** Espigas de *Dactylis glomerata*.

Además, esta planta es un excelente pasto forrajero, debido a sus altos rendimientos y contenidos en glúcidos (Ackerman *et al.*, 1987). En praderas artificiales es compatible con muchas leguminosas (*Medicago sativa*, *Lotus corniculatus* y varios *Trifolium*) y otras gramíneas (*Lolium perenne*, *Festuca arundinacea*, etc.). Cuando se aplican altos niveles de fertilización de nitrógeno es una de las gramíneas de clima templado más productivas. Su alto crecimiento y hábito de rebrote la hacen más apropiada para un pastoreo rotacional que continuo. También puede ser utilizada para el control de la erosión del suelo tras la tala de bosques y en hábitats propicios para la fauna silvestre, en zonas donde la introducción de especies forrajeras sea aceptable.

1.6.4.2. *Holcus lanatus*.

Es una especie perenne, a veces bianual. Se distribuye en zonas templadas de Eurasia y del noroeste de África (Hubbard, 1984). En España suele crecer en lugares relativamente húmedos, como suelos encharcados u orillas de ríos.

Presenta tallos de 20 a 100 cm de alto, densamente cubiertos de pelos blandos, así como las vainas y las hojas, lo que le da frecuentemente una apariencia ‘lanosa’ característica (Figura 11B). Sus hojas tienen un color verde grisáceo y son aterciopeladas, con venas moradas. La panícula puede tener hasta 15 cm de largo, y es relativamente floja. Posee glumas desiguales en anchura. La espiguilla tiene 2 flores desiguales, la superior más pequeña, con una arista encorvada en gancho (Figura 11A). (Hubbard, 1984). Florece en primavera, en los meses de mayo a julio.

Es una especie introducida en Norteamérica y en otras zonas templadas del mundo, que resulta ser una buena alternativa como recurso forrajero debido a su gran adaptabilidad.



Figura 11. A. Estructura de *Holcus lanatus*. CE, CH y CS: semillas. FL y ST: anteras. FS: lemas. G1 y G2: glumas. L₂: lema superior. LI: lígula. LL: lema inferior. LO: lodícula; P1 y P2: páleas. S: espiguilla. (Hubbard, 1984). **B.** Planta madura espigada de *Holcus lanatus*.

1.6.4.3. *Ammophila arenaria*.

Es una especie xerofítica y psamófila originaria de Eurasia y África. Se distribuye panclimáticamente en los cinco continentes (Tutin *et al.*, 1980; Hubbard, 1984).

Es una planta perenne, de porte alto, con tallos rectos que pueden medir entre 50 y 120 cm de altura (Figura 12A). Las hojas tienen un color verde grisáceo. Las flores son de color amarillo-paja reunidas en largas espigas con forma de huso (Figura 12B), y la floración se produce a partir del mes de mayo. Los frutos forman panículas bastante densas. Las raíces son bastante robustas. Se reproduce vegetativamente por medio de rizomas y posee glumas persistentes (Figura 12C) (Hubbard, 1984).

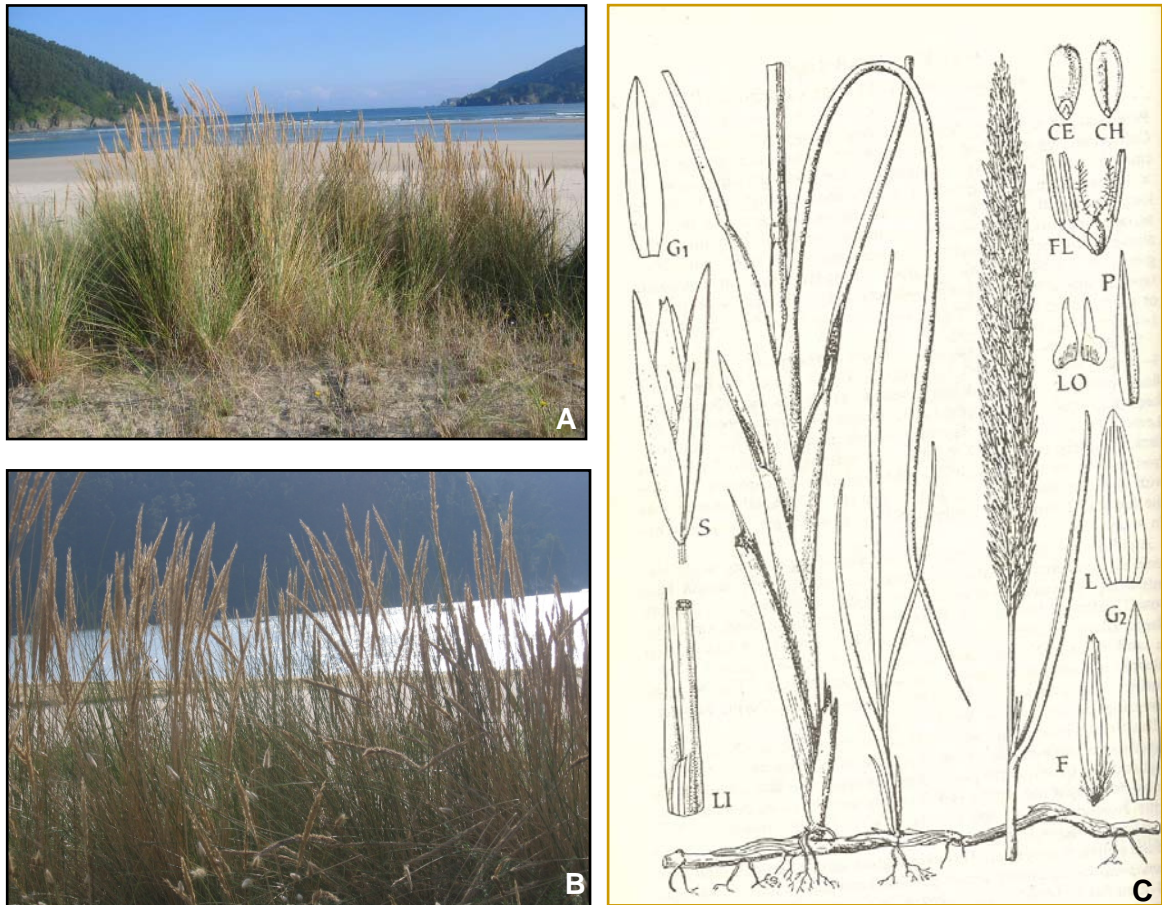


Figura 12. A. *Ammophila arenaria* en la costa de Cedeira, La Coruña. B. Espigas de *Ammophila arenaria*. C. Características morfológicas de *Ammophila arenaria*. CE y CH: semillas. F y L: lema. FL: anteras. G1 y G2: glumas. LI: lígula. LO: lodícula; P: pálea. S: espiguilla. (Hubbard, 1984).

1.6.4.4. *Elymus farctus*.

Elymus farctus (= *Agropyron junceiforme*) es una especie perenne, psamófila y xerofítica originaria de las costas Atlánticas de Europa. Se encuentra en arenales marítimos y sistemas de dunas, siendo frecuente en las playas junto con *Ammophila arenaria*, especie con la que habitualmente se encuentra en simpatría. De todas las especies de las dunas, es la que crece más cerca del mar, extendiéndose por la playa, muchas veces solapada con el primer cinturón de vegetación. Es resistente al enterramiento por arena en las dunas y tolera bien la sal. No soporta las zonas sombrías, y aguanta bien el calor. Prefiere inviernos suaves y la humedad elevada.

Su tamaño está en torno a los 20-60 cm (Figura 13B). Está provista de largos rizomas, de los que surgen tallos rígidos de entre 20 y 60 cm de longitud y bastante frágiles. Las hojas son grises azuladas, de 2 a 6 mm de ancho y son planas o convolutas, con venas prominentes y con una pilosidad densa en el haz; la lígula no alcanza el milímetro de longitud (Figura 13A). Como en todas las gramíneas, las espigas se disponen erectas o ligeramente curvadas, presentando una longitud de 4 a 20 cm. El raquis y las espiguillas son glabras (Figura 13A) (Hubbard, 1984). Florece en verano, como muchas plantas de las dunas.



Figura 13. A. Características morfológicas de *Elymus farctus*. BL: nervios de las hojas. CE y CH: semillas. FL: anteras. L: lema. G1 y G2: glumas. LI: lígula. LO: lodícula; P: pálea. S: espiguilla. (Hubbard, 1984). B. Espiga de *Elymus farctus*.

OBJETIVOS

En la actualidad, los hongos endofíticos mejor conocidos son algunas especies de *Neotyphodium* y *Epichloë*, que infectan a gramíneas. Diversos aspectos biológicos de estos hongos han sido bien estudiados e incluso el genoma de *E. festucae* ha sido secuenciado recientemente. Sobre otros tipos de endofitos la información disponible es escasa, tanto en gramíneas como en otras familias de plantas. El objetivo general de este trabajo es estudiar, desde el punto de vista de su diversidad biológica, las características de la micobiota endofítica asociada a cuatro especies de gramíneas adaptadas a distintos hábitats.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Realizar un censo y analizar la estructura de la micobiota endofítica de *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. La primera especie tiene una distribución muy variable, pero es común en pastos semiáridos y otras zonas con escasa humedad. Por el contrario, la segunda especie abunda en suelos encharcados o muy húmedos, mientras que las dos últimas especies crecen en simpatría en playas.
2. Comparar las micobiotas de las gramíneas simpátricas *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*, identificando las especies endofíticas generalistas y otras especializadas en un solo hospedador.
3. Estudiar las diferencias cuantitativas y cualitativas existentes entre las micobiotas presentes en distintos órganos de la planta: hojas, raíces y rizomas.
4. Estudiar el efecto de la distancia geográfica en la composición de la micobiota endofítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.

Las plantas muestreadas no presentaban, a simple vista, síntomas de enfermedad tales como clorosis, manchas en las hojas u otros tipos de lesiones causadas por patógenos. Todas las plantas fueron desenterradas en el campo y transportadas al laboratorio, donde fueron procesadas en menos de 48 horas para el aislamiento de hongos endofíticos.

Las plantas de *Dactylis glomerata* fueron muestreadas en 10 localidades de la provincia de Salamanca, 1 de Ávila, 1 de Cáceres y 2 de La Coruña (Tabla 1), siendo recogidas un total de 120 plantas durante el verano y el otoño de 2003 y a lo largo de los años 2004 y 2005.

En la provincia de Salamanca, las plantas fueron recogidas en diferentes hábitats ecológicos, como orillas de ríos, pastos semiáridos de dehesas o fuentes de aguas sulfurosas (Tabla 1). El número de plantas recolectado fue diferente entre localidades, y en cada localidad se dejó una distancia de unos 10 metros entre cada planta muestreada.

Tabla 1. Localidades y tipos de hábitat donde fueron muestreadas las plantas de *Dactylis glomerata*.

LOCALIDADES ^a	HÁBITAT	Nº PLANTAS
Beco, Cedeira. CO	Pradera costera	15
Calvarrasa de Arriba, SA	Orilla de río	8
Casas del Conde, SA	Orilla de río	1
Cristo de Cabrera, SA	Cunetas	9
El Cabaco, SA	Bosque de <i>Quercus pyrenaica</i>	13
Faro, Cedeira. CO	Pradera costera	15
Fuente Roldán, SA	Fuente de aguas sulfurosas	2
Los Montalvos, SA	Cuneta	7
Montemayor del Río, SA	Cañada	3
Muñovela, SA	Pastizal de <i>Quercus ilex</i>	6
Puente Mocho, SA	Orilla de río	12
Sagos, SA	Pastizal de <i>Quercus ilex</i>	2
Valvellidos, CC	Pradera	18
Villafranca de la Sierra, AV	Orilla de río	9

Nota. ^a Localidades de las provincias de AV: Ávila, CC: Cáceres, CO: La Coruña, SA: Salamanca.

Además de las 120 plantas asintomáticas, en Montemayor del Río (Salamanca), se muestrearon 11 plantas con lesiones en hojas y en tallos. Estas plantas fueron recolectadas para aislar patógenos de los márgenes de las lesiones. También fueron recolectados tallos secos en 2 localidades de Salamanca: Montemayor del Río (14 plantas), y Muñovela (5 plantas). Estas plantas se utilizaron para obtener cultivos de hongos saprofitos a partir de fructificaciones presentes en los tallos.

El número de plantas muestreadas de *Holcus lanatus* fue superior al del resto de gramíneas analizadas, ya que se recogieron un total de 196 plantas, en 28 localidades pertenecientes a las provincias de Cáceres, La Coruña, Oviedo, Salamanca y Zamora (Tabla 2). En cada localidad se recolectaron 7 plantas, dejando un espacio de al menos 10m entre cada planta muestreada. Las plantas fueron recogidas durante los años 2004, 2005 y 2006.

Tabla 2. Localidades y hábitats de muestreo de *Holcus lanatus*. En cada localidad fueron recogidas 7 plantas.

LOCALIDADES ^a	HÁBITAT
Aldeanueva del Camino. CC	Orilla de río
Asegur, río Hurdano. CC	Orilla de río
Cabezo, CC	Orilla de río
Camino rural, Hervás. CC	Orilla de río
Casas del Monte. Zona A. CC	Orilla de río
Casas del Monte. Zona B. CC	Orilla de río
Castañar gallego. Puerto Honduras. CC	Bosque de roble y castaño
Cerezal, CC	Orilla de río
Convento de San José de Batuecas, La Alberca. SA	Orilla de río
Cordobelas, CO	Cuneta
Cristo de la Salud. Puerto Honduras. CC	Bosque de roble y castaño
Garganta del Infierno. CC	Bosque de roble y castaño
Fragosa, río Hurdano. Zona norte. CC	Orilla de río
Fragosa, río Hurdano. Zona sur. CC	Orilla de río
Jerte, CC	Orilla de río
Jerte, río Jerte. CC	Orilla de río
Las Caldas, OV	Cuneta
Monasterio de Santa M ^a de Moreruela, zona A.	Huerto abandonado
Granja de Moreruela. ZA	
Monasterio de Santa M ^a de Moreruela, zona B.	Huerto abandonado
Granja de Moreruela. ZA	
Montemayor del Río, SA	Orilla de río
Moreruela de los Infanzones, ZA	Pradera
Plasencia, río Jerte. CC	Orilla de río
Puerto de Honduras. Bajada al Valle del Jerte. CC	Bosque de roble y castaño
Ruta Heidi, Puerto de Honduras. CC	Bosque de roble y castaño
Tábara. Zona A. ZA	Orilla de río
Tábara. Zona B. ZA	Orilla de río
Tábara. Zona C. ZA	Orilla de río
Torres del Carrizal, ZA	Pradera

Nota: ^a Localidades de las provincias de CC: Cáceres, CO: La Coruña, OV: Oviedo, SA: Salamanca, ZA: Zamora.

Las plantas de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus* fueron obtenidas en 7 localidades de la costa norte de Galicia (Figura 14). Esta zona se caracteriza por su clima húmedo Atlántico y una costa de acantilados rocosos entre los cuales hay algunas playas. En 4 de las playas (Doniños, Esteiro, Lago y Vilarube) las plantas fueron obtenidas de 2 ó 3 zonas alejadas al menos 500m. En cada localidad se recogieron 7 plantas de cada especie, dejando un espacio de 10m entre cada planta. En total se recogieron 84 plantas de cada especie, a lo largo de los años 2005 y 2006.

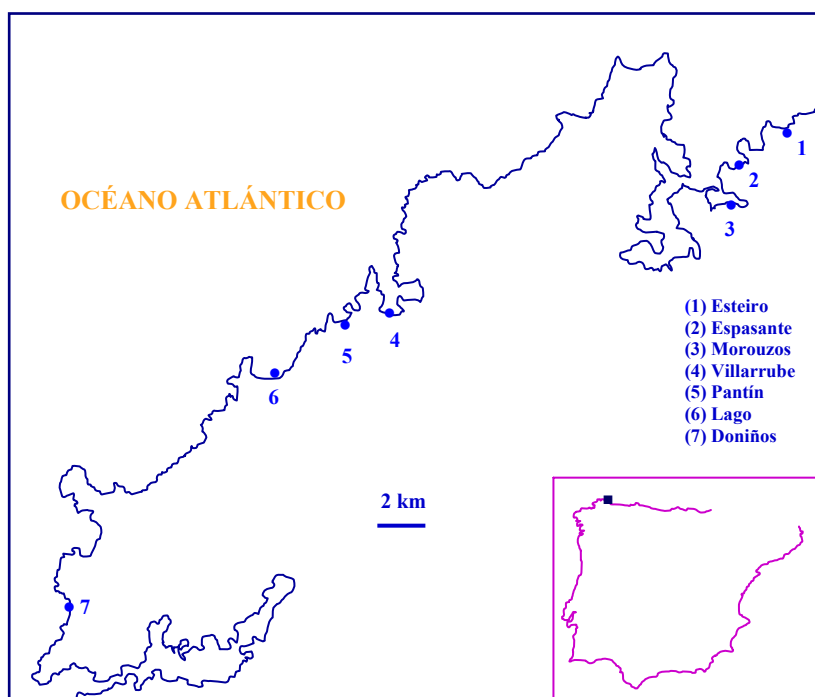


Figura 14. Localidades de muestreo de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus* en playas de siete localidades pertenecientes a la provincia de La Coruña. En las playas de las localidades 1, 4, 6 y 7, las plantas fueron recogidas en más de una zona.

3.2. AISLAMIENTO DE HONGOS.

Para aislar los endofitos de las plantas, se cortaron pequeños trozos de hojas y tallos de unos 5 mm de longitud, que se trataron en tubos con una solución de lejía comercial al 20% (1% de cloro activo) durante 10 minutos. El tratamiento de desinfección fue seguido de un lavado con agua estéril y a continuación se colocaron los fragmentos en placas Petri de 90 mm de diámetro, con agar de patata y dextrosa (PDA: 4 g/l de peptona de patata; 20 g/l de glucosa; 15 g/l de agar. Scharlau), conteniendo 200mg/l de cloranfenicol (Panreac).

Previamente a la desinfección con lejía, a los fragmentos de hojas de *Holcus lanatus* se les realizó un lavado con una solución acuosa al 0,005% de Tween 20 (polisorbato 20), que fue utilizado como surfactante, para facilitar el contacto de la solución de lejía con la superficie pilosa de las hojas.

Debido a la posible contaminación de las muestras con hongos del suelo, los fragmentos de raíces sufrieron un tratamiento más agresivo y fueron superficialmente desinfectados por medio de un lavado durante 5 minutos con etanol, seguido de un tratamiento con una solución al 1% de cloro activo durante 15 minutos, otra desinfección con etanol durante 2 minutos, y finalmente un lavado con agua estéril (Bills, 1996).

Para cada una de las plantas recogidas se prepararon 2 placas, conteniendo cada una aproximadamente 15 fragmentos de hojas, que se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente (22-26° C). Los fragmentos de tallos de 7 plantas de *Dactylis* fueron también preparados bajo este protocolo. Dos placas similares con fragmentos de raíces fueron preparadas para 82 de las 120 plantas de *Dactylis*, y para 116 plantas de *Holcus*. Para el estudio de *Ammophila* y *Elymus* se plaquearon hojas de 84 plantas de cada especie y rizomas de 48 plantas de cada hospedador.

Además, se realizaron aislamientos de 10 plantas de *Dactylis glomerata* con lesiones causadas por patógenos. Para ello, pequeñas piezas conteniendo bordes de lesiones fueron cortadas y plaqueadas en PDA tras una desinfección superficial con una solución al 1% de cloro activo y un posterior lavado con agua estéril. De los tallos secos de estas plantas con lesiones, se aislaron hongos usando agujas o extrayendo las fructificaciones y limpiándolas después en agar de agua, antes de ser plaqueadas en PDA.

Según iban emergiendo hongos de las piezas de hojas, tallos y raíces/rizomas, fragmentos de micelio eran transferidos a nuevas placas de PDA de 55 mm de diámetro (Figura 15). Estos aislados fueron mantenidos bajo luz natural y a temperatura ambiente.

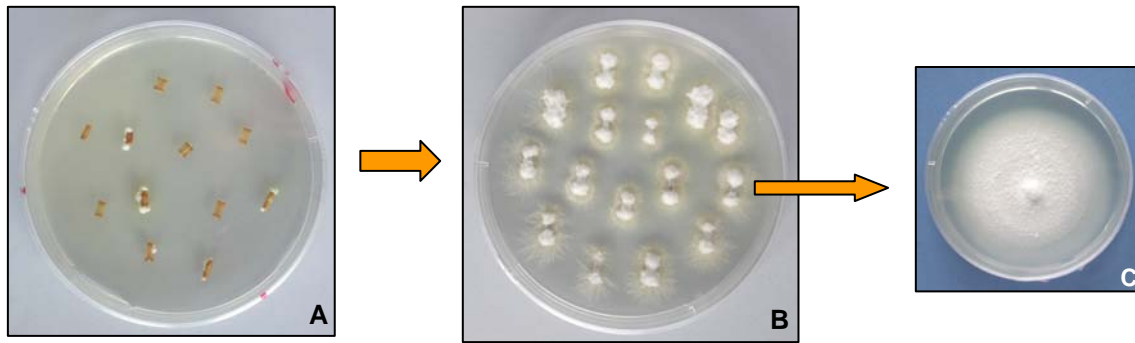


Figura 15. **A.** Placa Petri de PDA con 12 fragmentos de tallo de *Festuca rubra* de los cuales comienza a emerger el hongo endofítico *Epichloë festucae*. **B.** La misma placa con *Epichloë festucae* emergiendo de todos los trozos de tallo. **C.** Aislado de *Epichloë festucae* obtenido de un pequeño fragmento del micelio de uno de los tallos de la placa anterior.

Para inducir la esporulación de los aislados que no produjeron esporas en PDA, los hongos fueron plaqueados en otros medios de cultivo: agar extracto de malta (MEA) (Agar bacteriológico: 24 g/l; extracto de malta: 20 g/l. Scharlau), agar de agua (WA) (Agar bacteriológico: 24 g/l. Scharlau), y agar de agua con hojas de gramíneas autoclavadas (Figura 16); cada hongo fue plaqueado en WA con hojas del hospedador del que se aisló. Todos estos medios contenían 200 mg/l de cloranfenicol.

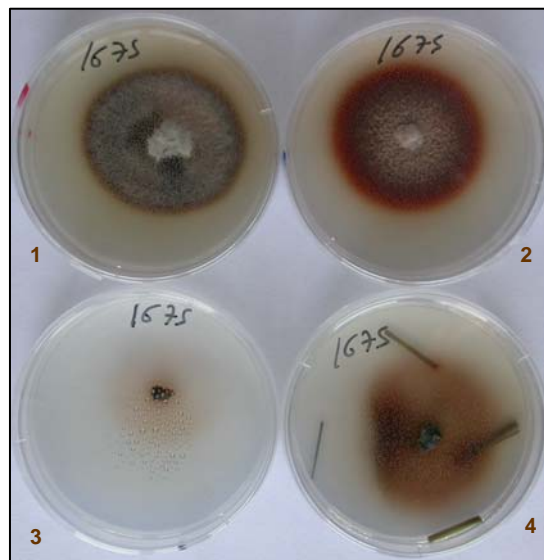


Figura 16. Cepa de *Leptodontidium orchidicola* aislada de *Dactylis glomerata* y plaqueada en: PDA (1), MEA (2), WA (3), y WA con hojas de *Dactylis glomerata* autoclavadas (4).

Para comprobar que el método de desinfección utilizado era efectivo para la eliminación de hongos epifitos, se realizó una impresión de fragmentos desinfectados de hojas, tallos y raíces, haciendo presión contra la superficie de placas de PDA, e incubando posteriormente las placas sin los fragmentos de planta. Estas placas fueron observadas periódicamente para determinar si había hongos que emergieran de las impresiones (Schulz *et al.*, 1998).

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.

3.3.1. Morfológica.

Los aislados obtenidos se observaron con lupa estereoscópica, para ver si el micelio había esporulado. Para la observación por microscopía óptica de los cultivos esporulados se prepararon tinciones con azul de lactofenol (26 ml de ácido láctico; 26 g de fenol; 52 ml de glicerol; 26 mg de azul de algodón; 26 ml de agua destilada. Scharlau) (Figura 17), que posteriormente se fijaron con ácido láctico. La identificación morfológica se realizó con la ayuda de varias claves de determinación de hongos (Ellis, 1971a, 1971b; Von Arx, 1981; Dennis, 1978; Ellis y Ellis, 1987; Barnett y Barry, 1998; Barnett y Hunter, 1998; Sutton, 1998; Hanlin, 2001 a, 2001b).

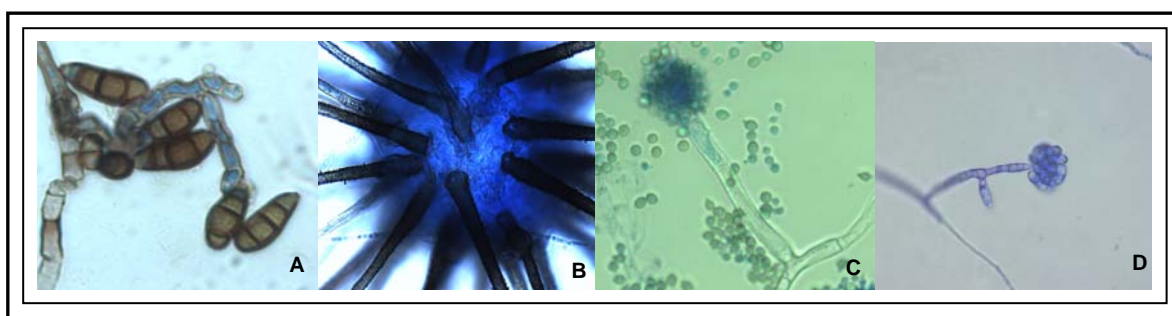


Figura 17. Fotografías realizadas mediante microscopía óptica, de algunos hongos endofíticos aislados en el estudio y que pudieron ser identificados morfológicamente, mediante tinción del micelio con azul de lactofenol. **A.** Conidios de *Curvularia inaequalis*. **B.** Picnidio con setas de *Colletotrichum* sp. **C.** Conidióforo y conidios de *Aspergillus terreus*. **D.** Conidióforo de *Acremonium strictum*.

Para la identificación morfológica de los aislados que no aparecían en las claves de determinación de hongos, o que presentaban una dificultad extrema debido a las escasas

diferencias entre especies, se contó con la colaboración del Dr. Gerald F. Bills, del Departamento de Investigación de Hongos del Centro de Investigación Básica de España de Merck, Sharp & Dohme.

3.3.2. Molecular.

Debido a que muchos de los hongos no esporularon en ninguno de los medios de cultivo utilizados, se realizó una identificación molecular basada en la secuencia nucleotídica de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (Figura 18). Esta técnica también se utilizó para verificar la identificación morfológica, en los casos en que esta pudo realizarse.

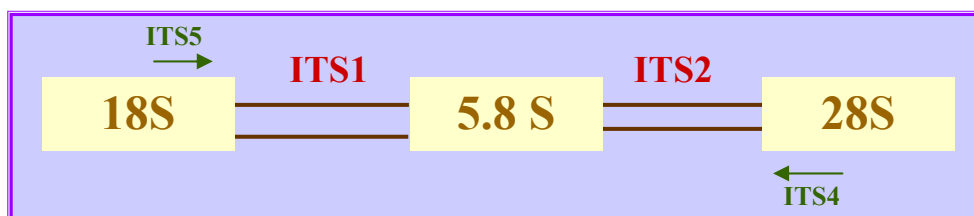


Figura 18. Estructura de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2, indicando la posición de los oligonucleótidos ITS4 e ITS5.

La extracción del DNA se realizó a partir de pequeños fragmentos de micelio raspados de la superficie de los cultivos, usando un kit comercial (RedExtract-N-Amp Plant PCR, Sigma Aldrich). Debido a que en algunos casos el extracto de DNA obtenido con el kit no amplificaba, los extractos se purificaron con la adición de 1 volumen de fenol saturado con 10mM Tris-HCl pH 8,0, la fase acuosa fue recogida tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos. Al sobrenadante se le añadió un volumen de cloroformo, se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm, recogiendo unos 80 µl de sobrenadante, el cual contenía el DNA que sería usado para la amplificación por PCR.

La región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fue amplificada mediante PCR con 2µl del extracto de DNA (excepto para los extractos de DNA pigmentados, para los cuales se añadía 1µl del extracto de DNA) y 3µl (0,5µM) por cada uno de los oligonucleótidos ITS4 (3'TCCTCCGCTTATTGATATGC5') e ITS5 (5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3') (White *et al.*, 1990) (Figuras 18 y 19). Las condiciones de la amplificación fueron las

siguientes: 95° C durante 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 54° C durante 1 minuto, y 72° C durante 1 minuto; tras estos ciclos la reacción fue mantenida a 72° C durante 10 minutos. El amplicón obtenido tras la PCR (Figura 19) fue purificado mediante filtración (MSB Spin PCRapace, Invitex), y secuenciado en el Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad de Salamanca, utilizando en kit “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” y usando un equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem®, EE.UU.).

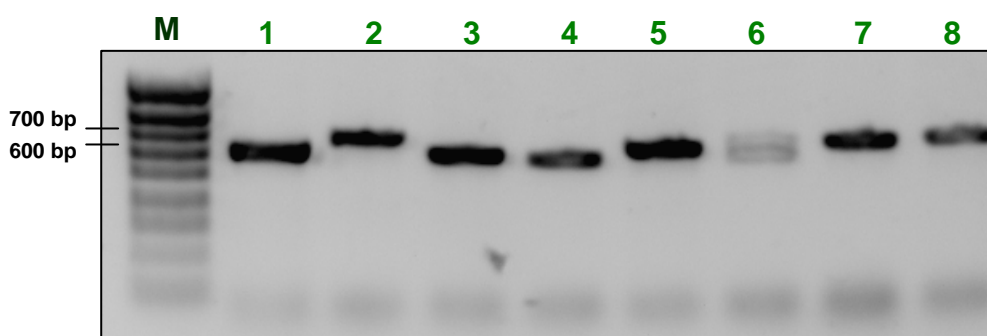


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa, mostrando los perfiles de bandas de DNA de 8 cepas de endofitos aislados en el estudio (carriles 1-8). M: marcador de peso molecular Eco Ladder IV (Ecogen). bp= pares de bases.

Para los aislados de *Dactylis glomerata*, solamente fue secuenciada una de las cadenas del amplicón, usando el oligonucleótido ITS4 (Figura 18). La calidad de la secuencia fue analizada por medio del cromatograma de la reacción de secuenciación, visualizado con el programa Chromas 1.45 (Technelysium, Australia) (Figura 20).

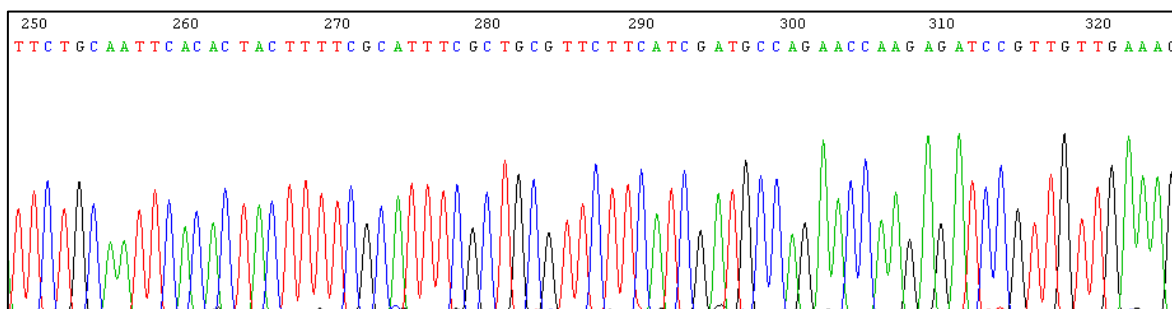


Figura 20. Cromatograma obtenido tras la secuenciación de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 con el oligonucleótido ITS4 de uno de los endofitos aislados de *D. glomerata*, y visualizado con el programa Chromas 1.45.

Las secuencias nucleotídicas fueron recortadas en el extremo 5' de la región ITS1. El principio de esta región fue identificado por medio de la secuencia conservada GATCAT, la cual se encuentra en el extremo 3' del gen 18S RNAr (Figura 18). El extremo 3' de cada secuencia fue recortado en la zona de secuencia donde el cromatograma mostró que la calidad de la secuencia era buena, y sin ambigüedades.

Para comprobar si la información obtenida de la secuenciación de una sola hebra del amplicón era útil para identificar hongos, ésta se comparó con la información obtenida de los amplicones de 12 aislados en los cuales se secuenciaron ambas hebras usando los primers ITS4 e ITS5 (Figura 18). La secuencia completa de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fue usada para analizar la fiabilidad de la información taxonómica obtenida con la correspondiente secuencia parcial. Para el resto de los hongos del estudio, las 2 cadenas del amplicón obtenido por PCR fueron secuenciadas. Las secuencias fueron recortadas en el motivo conservado GATCAT del extremo 5', y en GTTGACC en el extremo 3'.

Las secuencias de todos los aislados de cada gramínea fueron alineadas usando el programa ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) (Figura 21). Con estos datos, utilizando el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), se realizó un dendrograma con el método *Neighbour-Joining* (Saiton y Nei, 1987) y la distancia calculada según el método parámetro *Kimura 2-parámetros* (Kumar *et al.*, 2004). Los grupos de secuencias próximas en el dendrograma fueron examinados para determinar el porcentaje de semejanza entre los miembros del grupo. Para la mayoría de las especies de hongos, el rango de variación intraespecífica en secuencias ITS es desconocida (Taylor *et al.*, 2000), por lo cual determinamos que las secuencias con una similitud mayor del 97% fueran consideradas de la misma especie. Este porcentaje arbitrario ha sido utilizado en otros estudios de hongos (O'Brien *et al.*, 2005; Neubert *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2006).

Para encontrar secuencias similares a las obtenidas en la base de datos EMBL/Genbank de secuencias de hongos, se utilizó el algoritmo FASTA (Pearson, 1990). El criterio seguido para la identificación fue que en el caso de secuencias que poseían una homología mayor del 97% con la secuencia más parecida de la base de datos, eran aceptados el género y la especie; para secuencias que poseían una homología entre el 96,9% y el 95% era aceptado solamente el género, mientras que las secuencias que tenían

una homología menor de 95% con la especie más similar encontrada, en la base de datos, quedaban designadas como ‘especie desconocida’.

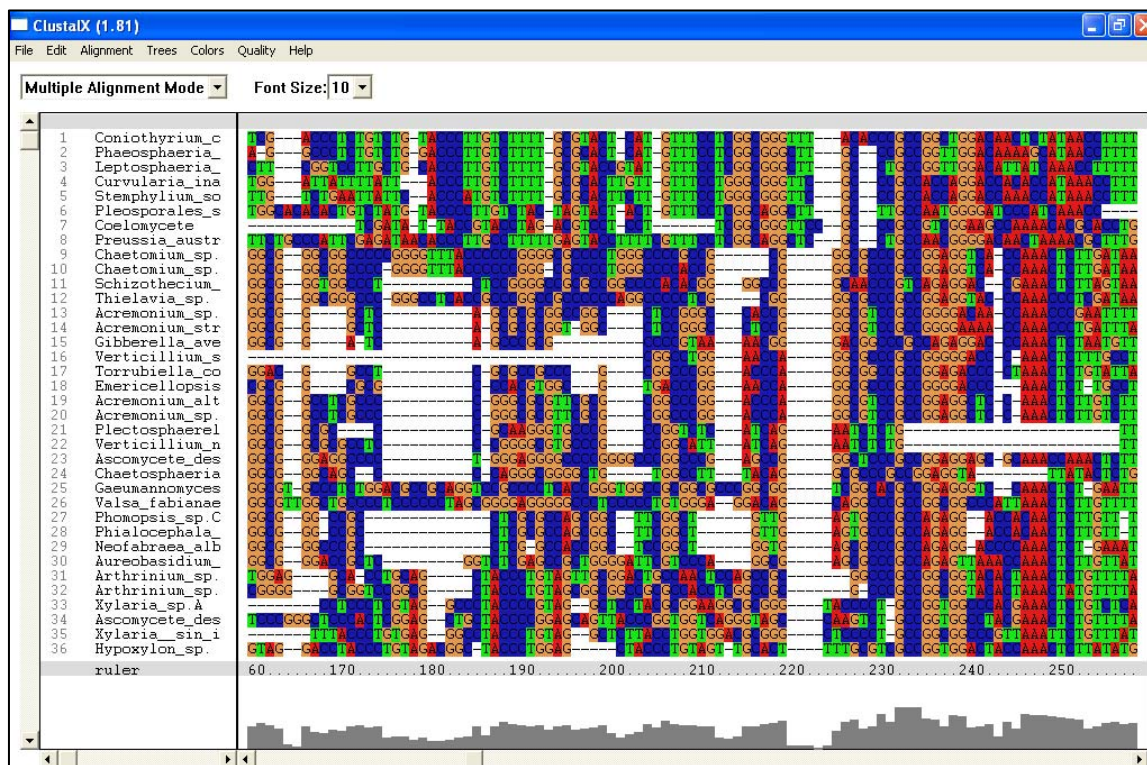


Figura 21. Alineamiento obtenido con el programa ClustalX 1.81 de las secuencias de DNA de los hongos endofíticos aislados de la gramínea *Elymus farctus*.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD FÚNGICA.

3.4.1. Índices de diversidad.

Los índices de diversidad están formados por dos componentes: el número o riqueza de especies, y el equilibrio o abundancia de cada especie (Ludwig y Reynolds, 1988; Gove *et al.*, 1994; Krebs, 1989). La literatura apunta la existencia de una gran cantidad de índices de diversidad. En este estudio se ha trabajado con uno de los más utilizados actualmente: el índice de diversidad de Shannon (Shannon, 1948; Whittaker 1972).

El índice de diversidad de Shannon (H') tiene en cuenta dos aspectos de la diversidad, la riqueza de las especies y la uniformidad de la distribución del número de

individuos de cada especie. Este índice H' tiene un valor de 0 si solo hay una especie, y alcanza su valor máximo si todas las especies del conjunto están representadas por un número igual de individuos (Zak y Willig, 2004). En la mayoría de los ecosistemas naturales H' varía entre 1 y 5. En nuestro estudio este índice fue calculado para las especies de cada hospedador observadas en cada localidad y para todas las especies observadas en cada hospedador en todas las localidades. El índice está basado en la abundancia relativa de cada taxón identificado (Zak y Willig, 2004). Su fórmula es:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

siendo p_i la proporción de individuos de la especie i en la comunidad, medida como la razón del número de individuos de la especie i (N_i) sobre el número total de individuos (N); $p_i = N_i / N$.

3.4.2. Curvas de acumulación de especies.

Uno de los métodos utilizados con más frecuencia para estudiar la riqueza de especies de una población son las curvas de acumulación de especies, que muestran el número de especies identificadas conforme se va aumentando el esfuerzo de muestreo, de manera que la riqueza aumentará hasta el momento en que por más que se aumente el muestreo, el número de especies alcance un máximo y la curva se estabilice en una asíntota (Figura 22, curva roja). En ciertas situaciones podrían obtenerse asíntotas antes de que muchas especies hubieran sido detectadas, sobre todo por efecto de la estacionalidad, la diversidad beta y la abundancia relativa de las especies.

La incorporación de nuevas especies al muestreo se relaciona con la medida del esfuerzo de muestreo. Cuanto mayor sea este esfuerzo, mayor será el número de especies identificadas. Al principio se observan sobre todo especies comunes, y la adición de especies se produce rápidamente; por tanto, la pendiente de la curva comienza siendo elevada. A medida que prosigue el muestreo son las especies raras las que hacen crecer la curva, por lo que la pendiente de la curva desciende. El momento en el que esta pendiente

se aproxima a cero se corresponde con el número total de especies que podemos encontrar en la zona estudiada, con los métodos utilizados y durante el tiempo en el que se llevó a cabo el muestreo. El tamaño y la composición de especies de un lugar determinado varía con el tiempo (Adler y Lauenroth, 2003), debido a una característica fundamental de la distribución espacial de las especies: sus rangos de distribución no son estables a lo largo del tiempo.

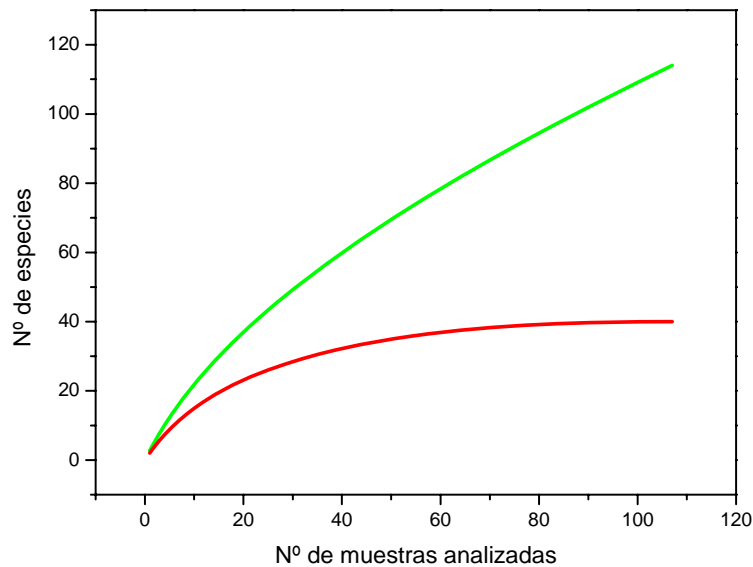


Figura 22. Curva de acumulación de especies asintótica (roja), y no asintótica (verde).

Las curvas de acumulación de especies son una herramienta importante en estudios de biodiversidad (Moreno y Halfpeter, 2000; Willott, 2001), haciendo de ellas un método sencillo y fiable para la valoración de la calidad de los estudios biológicos. Estas curvas permiten (Lamas *et al.*, 1991; Soberón y Llorente, 1993; Colwell y Coddington, 1994; Gotelli y Colwell, 2001):

- a) Dar fiabilidad a los estudios biológicos y posibilitar su comparación.
- b) Una mejor planificación del muestreo, tras estimar el esfuerzo requerido para conseguir datos fiables.
- c) Extrapolar el número de especies observadas en el estudio, para estimar el total de especies que podrían llegar a encontrarse.

En nuestro estudio, las curvas de acumulación de especies muestran la relación entre el número de plantas o localidades muestreadas y el número de especies de hongos

identificadas. Los cálculos para la elaboración de estas curvas se realizaron con el programa EstimateS 7.5 (Colwell, 2005), que realiza un muestreo aleatorio sin sustitución de las especies de hongos obtenidas de cada planta o localidad (Colwell y Coddington, 1994). Las curvas de acumulación de especies fueron también elaboradas únicamente para las especies plurales, representadas por más de un aislado, y por otra parte para las especies singulares o únicas, representadas por un único aislado.

3.4.3. Estimadores del número total de especies.

Para la estimación del número total de especies existentes en base a datos obtenidos en muestreos, se han desarrollado varios estimadores no paramétricos (Bunge y Fitzpatrick, 1993; Colwell y Coddington, 1994; Magurran, 2004), algoritmos que emplean proporciones de especies raras, únicas o *singulares*, especies que sólo cuentan con un individuo en una muestra o en todo el análisis, con las especies *dobles*, que cuentan con dos individuos en una muestra o en todo el análisis. Estos estimadores tienen su base estadística en las técnicas de estimación del número de clases a partir de muestras y de captura-recaptura (Heltsche y Forrester, 1983; Chao, 1984, 1987; Smith y van Belle, 1984; Chao y Lee, 1992; Bunge y Fitzpatrick, 1993).

Dado que los valores de las especies no observadas se basan en el número de especies raras observadas (Colwell y Coddington, 1994; Chazdon *et al.*, 1998), para estimar la riqueza se requiere de datos de la abundancia o de la incidencia de especies. En los estimadores de riqueza de especies más sencillos (Chao 1, Chao 2 o Jackknife 1 y 2 (Chao *et al.*, 2004), las especies raras se clasifican como especies con una abundancia total de 1 (singulares) o de 2 (dobles) en una muestra basada en la abundancia, y se encuentran solamente en una unidad de muestreo (únicos) o en dos unidades de muestreo (duplicados) en los datos de incidencia. El estimador ACE (del inglés *Abundance-based Coverage Estimator*) utiliza información adicional basada en especies con diez o menos individuos en la muestra (Chao *et al.*, 1993) y el estimador ICE (del inglés *Incidence-based Coverage Estimator*) se basa en las especies halladas en diez o menos unidades de muestreo (Lee y Chao, 1994; Chazdon *et al.*, 1998; Magurran, 2004).

Ya que los datos de especies obtenidos fueron de incidencia (presencia/ausencia) en cada una de las plantas analizadas, para estimar el número total de especies de endofitos que podrían estar asociadas con las 4 gramíneas, se calcularon los valores de algunos estimadores no paramétricos basados en la incidencia de especies: ICE, Chao 2, Jackknife 1, Jackknife 2, y Bootstrap, así como el estimador Michaelis-Menten (Magurran, 2004). Las fórmulas de los estimadores utilizados en el estudio se representan en la figura 23.

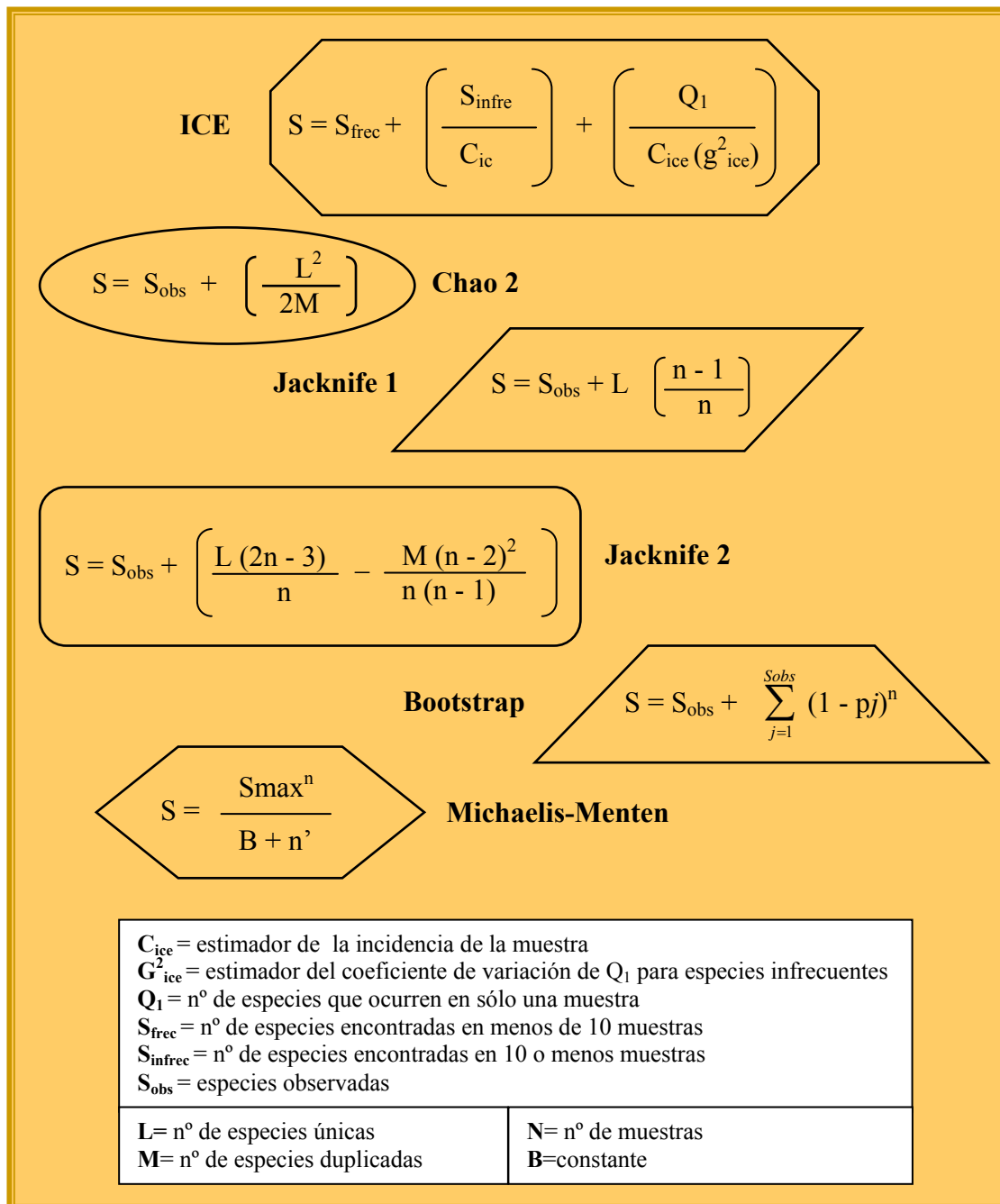


Figura 23. Fórmulas de los estimadores de la riqueza total de especies utilizados en el estudio.

3.4.4. Comparación de la micobiota entre hospedadores, tipos de tejidos y localidades.

En el estudio de la micobiota de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*, los endofitos fueron clasificados en especies aisladas exclusivamente de cada hospedador, o de ambos hospedadores. Las especies aisladas de los dos hospedadores fueron consideradas generalistas.

Las diferencias en las medias del número de especies presentes en hojas y raíces o rizomas fueron realizadas mediante el test de la t de Student (Pearson, 1939), con $\alpha = 0,05$. Los datos utilizados fueron, en el caso de *Ammophila* y *Elymus*, el número de especies observadas en 4 muestras de hojas y 4 de rizomas de cada localidad. En el caso de *Holcus lanatus*, los datos utilizados fueron el número de especies observadas en 11 localidades, en las cuales se habían hecho aislamientos de hojas y raíces.

Para comparar las micobiotas identificadas en distintas localidades, la similitud de la composición de especies en cada pareja de localidades fue estimada con el índice de similitud de Jaccard (Magurran, 2004):

$$J_{clas} = \frac{A}{A + B + C}$$

donde A es el número de elementos comunes a dos conjuntos, B es el número de elementos únicos de uno de los conjuntos, y C el número de elementos únicos de otro de los conjuntos. Es uno de los índices más utilizados para valorar la similitud en la composición de especies en una muestra y, por lo tanto, la falta de similitud. Este coeficiente está basado en la presencia o ausencia de las especies en cada ambiente, y su resultado vendría dado como la proporción o el porcentaje de especies compartidas (Southwood, 1987; Moreno, 2001).

En nuestro estudio, el índice de Jaccard fue calculado para cada planta o localidad con los datos de presencia/ausencia del total de especies de endofitos que aparecían en más de una localidad. Tras comprobar que estos datos se ajustaban a una distribución normal

usando el test de Kolmogorov-Smirnov (Chakravart *et al.*, 1967), la relación entre el índice de similaridad y la distancia entre localidades fue calculada por regresión lineal.

La similitud de las micobiotas de *Ammophila arenaria*, *Elymus farctus* y *Holcus lanatus* en cada una de las localidades a estudio fue estimada con el índice de Jaccard. También se usó este índice para estimar la similitud entre las micobiotas de *Ammophila arenaria* y *Elymus*, 2 gramíneas que crecen en simpatria, en las 12 localidades donde se recogieron estas plantas. Las comparaciones de similitud de las medias de las especies aisladas de *Ammophila*, *Elymus* y *Holcus* en hojas, raíces/rizomas y para el total de especies, fueron realizadas con el test de Student, con $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras los tratamientos de desinfección superficial utilizados, ningún hongo creció en las placas de control en las que fueron realizadas las impresiones de hojas, raíces o rizomas de las cuatro especies de gramíneas, lo que indica que los métodos de desinfección fueron eficientes para eliminar los posibles hongos epífitos de las plantas y que todos los hongos aislados tenían crecimiento endofítico.

4.1. MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE *Dactylis glomerata*.

4.1.1. Aislamiento de endofitos.

De un total de 120 plantas muestreadas, fueron obtenidos 1100 aislados. Una visualización conjunta de los aislados obtenidos de cada planta sirvió para descartar múltiples cultivos morfológicamente similares. Como resultado de esta preselección fueron procesados e identificados un total de 311 aislados (Tabla 3). Solamente de 9 plantas no se aisló ningún endofito. En las placas de PDA, el crecimiento de los hongos a partir de los fragmentos de las plantas fue relativamente rápido, emergiendo la mayoría de los endofitos en los 15 primeros días de incubación.

Solamente el 18% de los aislados obtenidos esporularon tras 6-8 semanas de incubación. Los aislados restantes produjeron micelio estéril. Cuando los aislados estériles en PDA fueron plaqueados en medios de cultivo alternativos, como agar de agua o agar de agua con hojas de *D. glomerata*, muchos de los aislados esporularon, pudiendo ser identificados morfológicamente. El total de aislados que esporularon fue del 80%.

Tabla 3. Localidades donde fueron muestreadas las plantas asintomáticas de *Dactylis glomerata*, mostrando el número de plantas recogidas, el número de aislados obtenidos y de especies identificadas en cada localidad.

LOCALIDADES ^a	Nº PLANTAS	Nº AISLADOS	AISLADOS/ PLANTA	Nº ESPECIES	ESPECIES/ PLANTA
Beco, Cedeira. Co	15	49	3,33	35	2,33
Calvarrasa de Arriba, Sa	8	46	5,88	34	4,25
Casas del Conde, Sa	1	1	1,00	1	1
Cristo de Cabrera, Sa	9	18	2,00	14	1,55
El Cabaco, Sa	13	28	2,23	26	2
Faro, Cedeira. Co	15	34	2,33	21	1,4
Fuente Roldán, Sa	2	11	5,50	10	5
Los Montalvos, Sa	7	9	1,29	8	1,14
Montemayor del Río, Sa	3	6	2,00	4	1,33
Muñovela, Sa	6	33	5,67	19	3,17
Puente Mocho, Sa	12	36	3,00	21	1,75
Sagos, Sa	2	5	2,50	4	2
Valvellidos, Ca	18	25	1,39	16	0,89
Villafranca de la Sierra, Av	9	10	1,11	7	0,78
TOTAL	120	311	2,63*	114	0,94*

Nota. ^a Localidades de las provincias de Co: La Coruña, Sa: Salamanca, Ca: Cáceres, Av: Ávila. * Media de aislados y de especies por planta.

4.1.2. Valor de las secuencias parciales para la identificación.

Las secuencias parciales obtenidas con el oligonucleótido ITS4 contienen la secuencia completa del ITS1 y del 5.8S rRNA, pero la mayoría están incompletas en el extremo 3' de la región ITS2. Por término medio, las secuencias contienen un 92% del total de la secuencia del ITS2 (Tabla 4).

Para comprobar si las secuencias parciales de estas características son fidedignas para la identificación de los aislados, de un subconjunto de 12 aislados elegidos al azar se obtuvieron las secuencias completas, secuenciando las 2 cadenas con los primers ITS4 e ITS5. En estos 12 casos, el taxón obtenido del programa FASTA que representaba una secuencia con mayor similitud a las la base de datos EMBL/Genbank dio el mismo resultado que la identificación aportada por el programa FASTA con la secuencia parcial (Tabla 5). Estos resultados sugieren que las secuencias parciales en el extremo 3' del ITS2, con las características generales descritas en la tabla 4, pueden ser tan útiles como las secuencias totales para identificar aislados.

Tabla 4. Dieciséis secuencias de endofitos de *D. glomerata* elegidas al azar, que fueron obtenidas por secuenciación de una única cadena. En la tabla se muestra el porcentaje la secuencia de ITS1, de 5.8S rRNA, de ITS2, y el porcentaje de la secuencia total obtenida.

Nº REFE- RENCIA	% DE SECUENCIA OBTENIDA*			% TOTAL SECUENCIA	SECUENCIA COMPLETA DE REFERENCIA EN EMBL
	ITS1	5.8rRNA	ITS2		
AM262369	100	100	100	100	AB079127- <i>Torrubiella confragosa</i>
AM262367	100	100	95,2	98,4	U77360- <i>Stagonospora arenaria</i>
AM262417	100	100	88,3	96,1	AY004781- <i>Drechslera dactylidis</i>
AM262413	100	100	100	100	AY853199- <i>Discula quercina</i>
AM262394	100	100	89,5	96,5	ASP279479- <i>Arthriniium</i> sp.
AM262445	100	100	91,1	97,0	AF346409- <i>Cunninghamella elegans</i>
AM262405	100	100	100	100	AB233343- <i>Glomerella graminicola</i>
AM262407	100	100	100	100	CCE293812- <i>Coniothyrium cereale</i>
AM262347	100	100	100	100	AY373928- <i>Penicillium restrictum</i>
AM262402	100	100	100	100	CFU279450- <i>Chaetomium funicola</i>
AM262409	100	100	72,1	91,7	AJ390425- <i>Creosphaeria sassafras</i>
AM262349	100	100	96,1	98,7	PMA246159- <i>Periconia macrospinoso</i>
AM262430	100	100	86,8	95,6	AY266144- <i>Helgardia anguioides</i>
AM262419	100	100	82,4	94,1	AF346409- <i>Cunninghamella elegans</i>
AM262397	100	100	83,1	94,4	AJ413985- <i>Aspergillus terreus</i>
AM262357	100	100	92,1	97,4	AJ246145- <i>Phomopsis</i> sp.
TOTAL	100	100	92,3	97,5	-

Nota. * Para estimar el porcentaje total de la secuencia obtenida, cada secuencia parcial fue comparada con la secuencia completa (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) de la entrada mas similar a nuestra secuencia en la base de datos de hongos EMBL/GenBank.

Tabla 5. Comparación de las identificaciones obtenidas por medio de búsquedas en la base de datos de secuencias de hongos con secuencias parciales y con sus correspondientes secuencias completas.

Nº REFE- RENCIA	SEC PARC (nt) ^a	SEC COMPL (nt) ^b	IDENTIDAD FASTA CON SECUENCIA PARCIAL	VALOR E ^c	IDENTIDAD FASTA CON SECUENCIA COMPLETA	VALOR E ^c
AM262408	353	472	<i>Beauveria bassiana</i>	1,9x10 ⁻⁷¹	<i>Beauveria bassiana</i>	3,2x10 ⁻⁷⁰
AM262444	503	594	<i>Mortierella alpina</i>	3,8x10 ⁻⁸⁴	<i>Mortierella alpina</i>	2,3x10 ⁻⁹⁰
AM262418	468	482	<i>Embellisia eureka</i>	5,8x10 ⁻⁶⁶	<i>Embellisia eureka</i>	4,8x10 ⁻⁷²
AM262430	520	535	<i>Helgardia anguioides</i>	2,5x10 ⁻⁶⁶	<i>Helgardia anguioides</i>	2,3x10 ⁻⁷⁷
AM262441	452	499	<i>Rhodotorula minuta</i>	1,3x10 ⁻⁵⁸	<i>Rhodotorula minuta</i>	6,4x10 ⁻⁶⁹
AM262371	479	517	<i>Valsa ceratosperma</i>	6,3x10 ⁻⁵³	<i>Valsa ceratosperma</i>	3,1x10 ⁻⁶⁷
AM262439	483	604	<i>Mycena murina</i>	5,5x10 ⁻⁷⁶	<i>Mycena murina</i>	9,8x10 ⁻⁹³
AM262979	535	547	<i>Ustilago williamsii</i>	1,9x10 ⁻⁵⁷	<i>Ustilago williamsii</i>	1,7x10 ⁻⁵⁷
AM262403	452	500	Endofitos de raíz de <i>Epacris</i>	2,4x10 ⁻⁴⁵	Endofitos de raíz de <i>Epacris</i>	3,5x10 ⁻⁵²
AM262343	415	507	<i>Talaromyces ohiensis</i>	5,9x10 ⁻³⁶	<i>Talaromyces ohiensis</i>	2,9x10 ⁻⁴¹
AM262424	457	466	<i>Eurotium amstelodami</i>	1,7x10 ⁻⁵⁹	<i>Eurotium amstelodami</i>	6,8x10 ⁻⁶¹
AM262431	479	515	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	6x10 ⁻⁵³	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	1,2x10 ⁻⁵⁴

Nota. ^a Tamaño de secuencias parciales, obtenidas mediante reacciones de secuenciación con el primer ITS4 (White *et al.*, 1990). Las características de estas secuencias se muestran en la tabla 4. ^b Tamaño de secuencias completas, obtenidas por secuenciación de las 2 cadenas del replicón. ^c Número de resultados positivos de la base de datos que se podrían encontrar debido al azar.

4.1.3. Identificación de los aislados.

El 65,8% de las especies aisladas esporularon y se pudieron utilizar caracteres morfológicos para su identificación. Además, los caracteres moleculares sirvieron para contrastar la identificación morfológica de los cultivos esporulados, o para identificar los aislados estériles. En todos los casos la identificación morfológica y molecular coincidieron en la identidad de los aislados. En el caso de la identificación por medio de caracteres moleculares, para identificar aislados pertenecientes a la misma especie se elaboró un dendrograma con todas las secuencias obtenidas, un total de 202. Cada rama del dendrograma con secuencias similares fue analizada, y los aislados cuyas secuencias diferían en menos de un 3% de su secuencia nucleotídica fueron considerados de la misma especie. Establecer esta distinción de especies implicó que aislados de géneros como *Arthrinium*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Phomopsis* y *Stagonospora*, se agruparan en diferentes especies, denominadas A, B, C, etc. (Figura 25). Aplicando este criterio, las secuencias sirvieron para identificar 105 especies de hongos (Figuras 24 y 25). Las secuencias seleccionadas también permitieron elaborar dendrogramas donde se reflejan las relaciones entre los aislados de Basidiomycetes y Ascomycetes basadas en la similitud de las secuencias de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (Figuras 24 y 25).

Un grupo de hongos estériles pertenecientes a 18 taxones diferentes no pudieron ser identificados a nivel de género por tener secuencias muy diferentes de las registradas en la base de datos EMBL (Tabla 6). Del mismo modo, los que tenían secuencias similares, por no corresponderse con ningún taxon identificado (Tabla 6). Sin embargo, las secuencias sirvieron para distinguir estas especies de otras y para clasificar estos hongos como Ascomycetes o Basidiomycetes. Las secuencias nucleotídicas de cada especie fueron enviadas a la base de datos EMBL/Genbank).

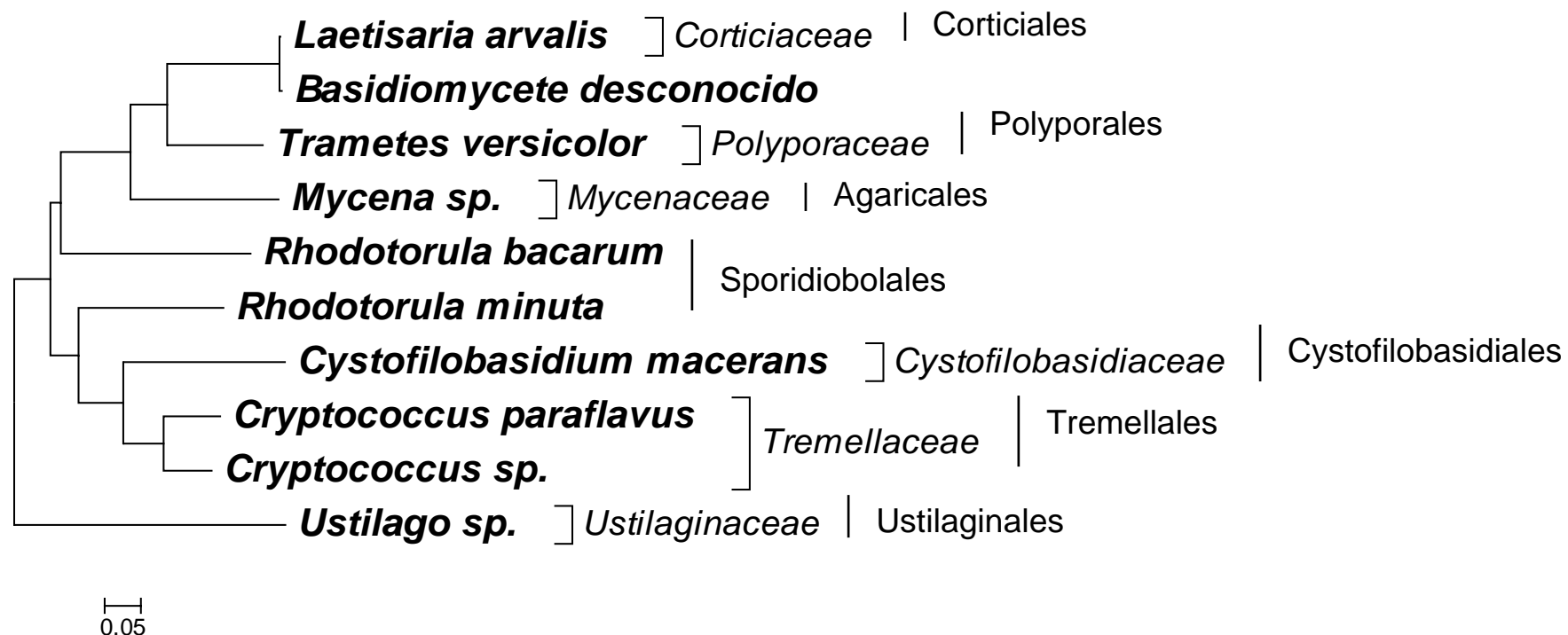


Figura 24. Dendrograma realizado con las secuencias de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 de Basidiomycetes mediante el método Neighbour-Joining, y con la distancia genética calculada según el método Kimura 2-parameter. Los corchetes indican familias y las líneas verticales órdenes. La barra de la escala (0,05) indica 5 sustituciones cada 100 nucleótidos.

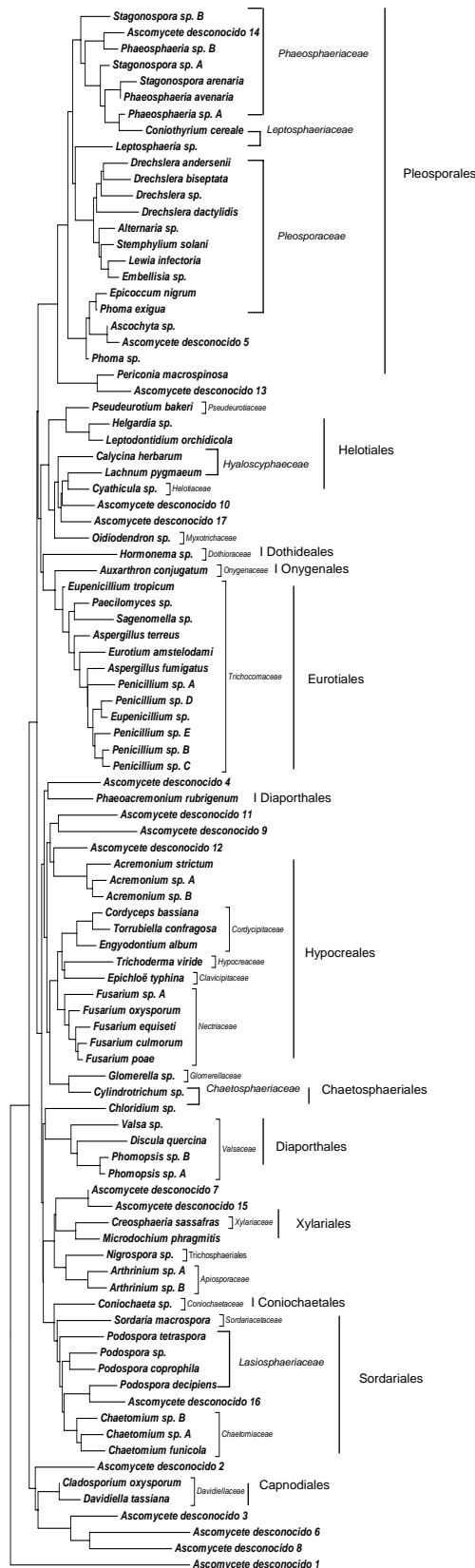


Figura 25. Dendrograma elaborado con las secuencias de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de los Ascomycetes de *Dactylis glomerata* y realizado con el método Neighbour-Joining, y con la distancia genética calculada según el método Kimura 2-parámetros. Los corchetes indican familias y las líneas verticales órdenes. La barra de la escala (0,05) indica 5 sustituciones cada 100 nucleótidos.

Tabla 6. Especies de endofitos aislados de *Dactylis glomerata* e identificados por medio de caracteres morfológicos y/o moleculares, y aislados que no pudieron ser identificados debido a la esterilidad del cultivo y a la baja homología con secuencias nucleotídicas conocidas, o alta homología con secuencias de hongos no identificadas en la base de datos del EMBL.

Nº REFE- RENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ^a	% IDENTIDAD FASTA ^a	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	Nº AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
-	<i>Cladosporium</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Cladosporium</i> sp.	17	3	20
AM262430	<i>Helgardia</i> sp.	<i>Helgardia</i> sp.	96,95	<i>Helgardia</i> sp.	11	7	18
AM262390	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium strictum</i>	99,80	<i>Acremonium strictum</i>	17	0	17
-	<i>Penicillium</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Penicillium</i> sp.	6	10	16
AM262393	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	100,00	<i>Alternaria</i> sp.	12	2	14
-	<i>Epicoccum</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Epicoccum</i> sp.	10	4	14
-	<i>Podospora</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Podospora</i> sp.	9 ^f	3	12
-	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	8 ^f	2	10
AM262420	<i>Epichloë typhina</i>	<i>Epichloë typhina</i>	100,00	<i>Epichloë typhina</i>	8	0	8
AM262425	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	100,00	<i>Fusarium</i> sp. A	5	3	8
AM262400	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	99,60	<i>Chaetomium</i> sp. A	6 ^f	1	7
AM262340	<i>Microdochium phragmitis</i>	<i>Microdochium phragmitis</i>	100,00	<i>Microdochium phragmitis</i>	6	0	6
AM262407	Micelio estéril	<i>Coniothyrium cereale</i>	100,00	<i>Coniothyrium cereale</i>	5	0	5
AM262414	Micelio estéril	<i>Drechslera</i> sp.	99,83	<i>Drechslera</i> sp.	2	3	5
AM262433	Micelio estéril	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	98,38	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	3	2	5
AM262426	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium culmorum</i>	100,00	<i>Fusarium culmorum</i>	3	1	4
AM262344	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99,04	<i>Penicillium</i> sp. A	1	3	4
AM262345	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	98,85	<i>Penicillium</i> sp. B	2	2	4
AM262347	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99,61	<i>Penicillium</i> sp. D	2	2	4
AM262348	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	100,00	<i>Penicillium</i> sp. E	2	2	4
AM262351	Micelio estéril	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	99,60	<i>Phaeosphaeria</i> sp. A	2	2	4
AM262405	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Glomerella</i> sp.	97,33	<i>Glomerella</i> sp.	3	0	3
AM262408	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Cordyceps bassiana</i>	100,00	<i>Cordyceps bassiana</i>	3	0	3
AM262416	<i>Drechslera biseptata</i>	<i>Drechslera biseptata</i>	99,82	<i>Drechslera biseptata</i>	3 ^f	0	3
AM262417	Micelio estéril	<i>Drechslera dactylidis</i>	99,82	<i>Drechslera dactylidis</i>	2	1	3
AM262428	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,36	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	2	3
AM262434	Micelio estéril	<i>Leptosphaeria</i> sp.	99,58	<i>Leptosphaeria</i> sp.	3	0	3
AM262360	Micelio estéril	<i>Podospora decipiens</i>	100,00	<i>Podospora decipiens</i>	3 ^f	0	3
AM262370	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i>	100,00	<i>Trichoderma viride</i>	2	1	3
AM262392	<i>Acremonium</i> sp. B ^b	<i>Nectria mauritiicola</i>	91,37	<i>Acremonium</i> sp. B	2	0	2

Tabla 6. Continuación.

Nº REFE- RENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ^a	% IDENTIDAD FASTA ^a	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	Nº AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
AM262394	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	92,62	<i>Arthrinium</i> sp. A	2	0	2
AM262395	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	100,00	<i>Arthrinium</i> sp. B	2	0	2
AM262410	Micelio estéril	<i>Cyathicula</i> sp.	97,70	<i>Cyathicula</i> sp.	1 ^f	1	2
AM262412	Micelio estéril	<i>Davidiella tassiana</i>	100,00	<i>Davidiella tassiana</i>	2	0	2
AM262422	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Eupenicillium</i> sp.	98,43	<i>Eupenicillium</i> sp.	0	2	2
AM262443	<i>Laetisaria arvalis</i> ^{b,d}	<i>Amauroderma subresinosum</i>	77,15	<i>Laetisaria arvalis</i>	2	0	2
AM262343	<i>Paecilomyces</i> sp. ^b	<i>Talaromyces ohiensis</i>	94,63	<i>Paecilomyces</i> sp.	2	0	2
AM262346	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99,81	<i>Penicillium</i> sp. C	0	2	2
AM262353	Micelio estéril	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	98,54	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	2	0	2
AM262364	<i>Sordaria</i> sp.	<i>Sordaria macrospora</i>	99,81	<i>Sordaria macrospora</i>	0	2	2
AM262368	Micelio estéril	<i>Stemphylium solani</i>	99,23	<i>Stemphylium solani</i>	2	0	2
AM262371	Micelio estéril	<i>Valsa</i> sp.	95,65	<i>Valsa</i> sp.	2	0	2
AM262391	<i>Acremonium</i> sp. A ^b	<i>Nectria mauritiicola</i>	89,72	<i>Acremonium</i> sp. A	1	0	1
-	<i>Arthrinium</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Arthrinium</i> sp.	1	0	1
AM262396	Micelio estéril	<i>Ascochyta</i> sp.	96,15	<i>Ascochyta</i> sp.	1	0	1
AM490816	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i> sp.	98,43	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	1	1
AM262397	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus terreus</i>	99,18	<i>Aspergillus terreus</i>	0	1	1
AM262398	<i>Auxarthron compactum</i>	<i>Auxarthron conjugatum</i>	99,78	<i>Auxarthron conjugatum</i>	1	0	1
AM262399	Anamorfo de <i>Phialophora</i>	<i>Calycina herbarum</i>	98,64	<i>Calycina herbarum</i>	1	0	1
AM262401	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	95,10	<i>Chaetomium</i> sp. B	0	1	1
AM262402	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium funicola</i>	98,65	<i>Chaetomium funicola</i>	1	0	1
AM262403	<i>Chloridium</i> sp. ^b	Endofito de raíz de <i>Epacris</i>	91,45	<i>Chloridium</i> sp.	1	0	1
AM262404	Micelio estéril	<i>Cladosporium oxysporum</i>	100,00	<i>Cladosporium oxysporum</i>	1	0	1
AM262406	<i>Coniochaeta</i> sp. ^b	Ascomycete sp.	92,55	<i>Coniochaeta</i> sp.	0	1	1
AM262409	Anamorfo de <i>Libertella</i>	<i>Creosphaeria sassafras</i>	99,78	<i>Creosphaeria sassafras</i>	1	0	1
AM262437	Levadura rosa	<i>Cryptococcus</i> sp. ^d	99,09	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	0	1
AM262436	Levadura rosa	<i>Cryptococcus paraflavus</i> ^d	99,02	<i>Cryptococcus paraflavus</i>	1	0	1
AM262445	<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>	99,50	<i>Cunninghamella elegans</i>	0	1	1
AM262411	<i>Cylindrotrichum</i> sp. ^b	<i>Glomerella cingulata</i>	85,06	<i>Cylindrotrichum</i> sp.	1	0	1
AM262438	Levadura naranja	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	100,00	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	1	0	1
AM262413	Coelomycete	<i>Discula quercina</i>	100,00	<i>Discula quercina</i>	1 ^f	0	1
AM262415	Micelio estéril	<i>Drechslera andersenii</i>	100,00	<i>Drechslera andersenii</i>	1	0	1

Tabla 6. Continuación.

Nº REFE- RENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ^a	% IDENTIDAD FASTA ^a	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	Nº AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
AM262418	Micelio estéril	<i>Embellisia</i> sp.	98,44	<i>Embellisia</i> sp.	1	0	1
AM262419	<i>Engyodontium album</i>	<i>Engyodontium album</i>	99,43	<i>Engyodontium album</i>	1	0	1
AM262421	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>	99,80	<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0	1
AM262423	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Eupenicillium tropicum</i>	99,73	<i>Eupenicillium tropicum</i>	0	1	1
AM262424	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>	99,41	<i>Eurotium amstelodami</i>	0	1	1
AM262427	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium equiseti</i>	100,00	<i>Fusarium equiseti</i>	0	1	1
AM262429	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium poae</i>	98,67	<i>Fusarium poae</i>	0	1	1
AM262431	<i>Hormonema</i> sp. ^b	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	91,15	<i>Hormonema</i> sp.	1 ^f	0	1
AM262432	Micelio estéril	<i>Lachnum pygmaeum</i>	97,61	<i>Lachnum pygmaeum</i>	0	1	1
AM262444	<i>Mortierella alpina</i>	<i>Mortierella alpina</i>	99,35	<i>Mortierella alpina</i>	1	0	1
AM262439	Basidiomycete	<i>Mycena</i> sp. ^d	95,10	<i>Mycena</i> sp.	0	1	1
AM262341	<i>Nigrospora</i> sp.	Hongo endofítico	96,77	<i>Nigrospora</i> sp.	1	0	1
AM262342	<i>Oidiodendron</i> sp.	<i>Oidiodendron</i> sp.	99,54	<i>Oidiodendron</i> sp.	0	1	1
AM262349	Micelio estéril	<i>Periconia macrospinosa</i>	100,00	<i>Periconia macrospinosa</i>	0	1	1
AM262350	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	99,78	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	1	0	1
AM262352	Micelio estéril	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	95,05	<i>Phaeosphaeria</i> sp. B	1	0	1
AM262354	Micelio estéril	<i>Phoma</i> sp.	98,93	<i>Phoma</i> sp.	1	0	1
AM262355	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma exigua</i>	99,78	<i>Phoma exigua</i>	1	0	1
AM262356	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	99,38	<i>Phomopsis</i> sp. A	0	1	1
AM262357	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	96,23	<i>Phomopsis</i> sp. B	0	1	1
AM262358	Micelio estéril	<i>Podospora</i> sp.	95,26	<i>Podospora</i> sp.	0	1	1
AM262359	<i>Podospora</i> sp.	<i>Podospora coprophila</i>	99,80	<i>Podospora coprophila</i>	0	1	1
AM262361	Micelio estéril	<i>Podospora tetraspora</i>	99,59	<i>Podospora tetraspora</i>	1	0	1
AM262362	<i>Pseudeurotium</i> sp.	<i>Pseudeurotium bakeri</i>	100,00	<i>Pseudeurotium bakeri</i>	0	1	1
AM262440	Levadura sin identificar	<i>Rhodotorula bacarum</i> ^d	99,39	<i>Rhodotorula bacarum</i>	1	0	1
AM262441	Levadura sin identificar	<i>Rhodotorula minuta</i> ^d	99,79	<i>Rhodotorula minuta</i>	1	0	1
AM262363	<i>Sagenomella</i> sp. ^b	<i>Talaromyces purpureus</i>	85,83	<i>Sagenomella</i> sp.	0	1	1
AM262367	Micelio estéril	<i>Stagonospora arenaria</i>	99,50	<i>Stagonospora arenaria</i>	1	0	1
AM262365	Micelio estéril	<i>Stagonospora</i> sp.	98,92	<i>Stagonospora</i> sp. A	1	0	1
AM262366	Micelio estéril	<i>Stagonospora</i> sp.	95,20	<i>Stagonospora</i> sp. B	1	0	1
AM262369	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Torrubiella confragosa</i>	99,24	<i>Torrubiella confragosa</i>	1	0	1
AM262442	Basidiomycete	<i>Trametes versicolor</i> ^d	99,27	<i>Trametes versicolor</i>	1	0	1

Tabla 6. Continuación.

Nº REFE- RENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR ^a	% IDENTIDAD FASTA ^a	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	Nº AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
-	<i>Ulocladium</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Ulocladium</i> sp.	1	0	1
AM262979	Levadura sin identificar	<i>Ustilago</i> sp. ^d	95,04	<i>Ustilago</i> sp.	1	0	1
AM262387	Micelio estéril	<i>Bisporella citrina</i>	88,3	Ascomycete desconocido 1	1	0	1
AM262372	Micelio estéril	<i>Stenella araguata</i>	81,92	Ascomycete desconocido 2	1	0	1
AM262373	Micelio estéril	<i>Dactylaria ampulliformis</i>	79,38	Ascomycete desconocido 3	1	0	1
AM262374	Micelio estéril	<i>Magnaporthe grisea</i>	91,22	Ascomycete desconocido 4	1	0	1
AM262377	Micelio estéril	Ascomycete sp.	97,20	Ascomycete desconocido 5	1	0	1
AM262375	Micelio estéril	Hongo endofítico	90,68	Ascomycete desconocido 6	1	0	1
AM262376	<i>Xylariaceae</i>	<i>Xylaria cornu damae</i>	89,58	Ascomycete desconocido 7	1	0	1
AM262389	Micelio estéril	<i>Verticillium</i> sp.	100,00	Ascomycete desconocido 8	1	0	1
AM262378	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium strictum</i>	74,94	Ascomycete desconocido 9	1	0	1
AM262379	Micelio estéril	<i>Cistella grevillei</i>	92,34	Ascomycete desconocido 10	1	0	1
AM262380	Micelio estéril	<i>Stachybotrys cylindrospora</i>	71,68	Ascomycete desconocido 11	1	0	1
AM262388	<i>Acremonium</i> sp.	Ascomycete de hojarasca	79,57	Ascomycete desconocido 12	1	0	1
AM262381	Micelio estéril	Ascomycete de hojarasca	92,75	Ascomycete desconocido 13	1	0	1
AM262385	Micelio estéril	Ascomycete sp.	90,82	Ascomycete desconocido 14	1	0	1
AM262382	Micelio estéril	Hongo endofítico	90,65	Ascomycete desconocido 15	0	1	1
AM262383	Micelio estéril	<i>Podospira cochleariformis</i>	94,78	Ascomycete desconocido 16	1	0	1
AM262384	Micelio estéril	Endofitos de raíces de <i>Epacris microphylla</i>	99,54	Ascomycete desconocido 17	1	0	1
AM262386	Micelio estéril	Basidiomycete de bambú	95,04	Basidiomycete desconocido	1	0	1

Nota. ^a La semejanza con secuencias nucleotídicas de la base de datos EMBL/Genbank fue el criterio usado para asignar a un grupo taxonómico y fueron comparadas con el programa FASTA. ^b La identificación morfológica fue considerada la opción correcta en los casos en que los resultados de la base de datos correspondían a un taxón diferente con una similitud menor del 95%. ^c n.s.: hongo no secuenciado. ^{d,e} Todas las especies de la lista son Ascomycetes, excepto 9 Basidiomycetes^d, y 2 Zygomycetes^e. ^f Aislados que fueron obtenidos de muestras de tallos de 7 plantas. Para los 5 taxones que presentan más de un aislado, los endofitos también se obtuvieron de muestras de hojas.

En total, 107 especies diferentes fueron identificadas mediante caracteres morfológicos y/o moleculares. A este número hay que añadir 7 especies identificadas únicamente por medio de caracteres morfológicos, siendo 114 el total de especies de endofitos identificadas en las 107 plantas de *Dactylis glomerata*.

Únicamente de 82 plantas se realizaron aislamientos de endofitos de las raíces. Por lo tanto, el número de aislados obtenido de parte aérea fue mayor que el obtenido de la parte subterránea (228 aislados de hojas frente a 83 aislados de raíces), al igual que lo fue el número de especies (91 de hojas frente a 44 de raíces). El método de esterilización superficial usado en raíces fue más agresivo que el usado en hojas y es posible que haya eliminado algunos endofitos de las raíces.

De las 114 especies identificadas 70 fueron aisladas sólo de hojas, 23 únicamente de raíz, y 21 especies fueron aisladas tanto de la parte aérea como de la subterránea (Tabla 6).

Además, ocho especies de hongos fueron aisladas de muestras de tallos de 7 plantas. Tres de estas especies fueron obtenidas solo de muestras de tallos; mientras que las otras 5 también se aislaron de muestras de hojas (Tabla 6).

Las especies de hongos aisladas de zonas de tejido enfermo en plantas con síntomas de enfermedad (Figura 26), y de fructificaciones de tallos secos (Figura 27) están descritas en la tabla 7. Muchos de los hongos aislados de tejido enfermo pertenecen a géneros o especies citados como patógenos de *Dactylis* por Farr *et al.* (1989).

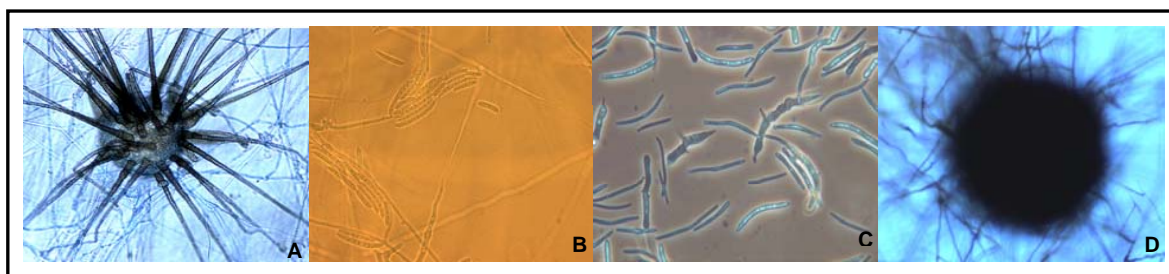


Figura 26. Fotografías a microscopía óptica de algunos de los hongos aislados de lesiones de *Dactylis glomerata*. **A.** *Colletotrichum falcatum*. **B.** *Fusarium lateritium* **C.** *Septoria passerinii*. **D.** *Stemphylium solani*.

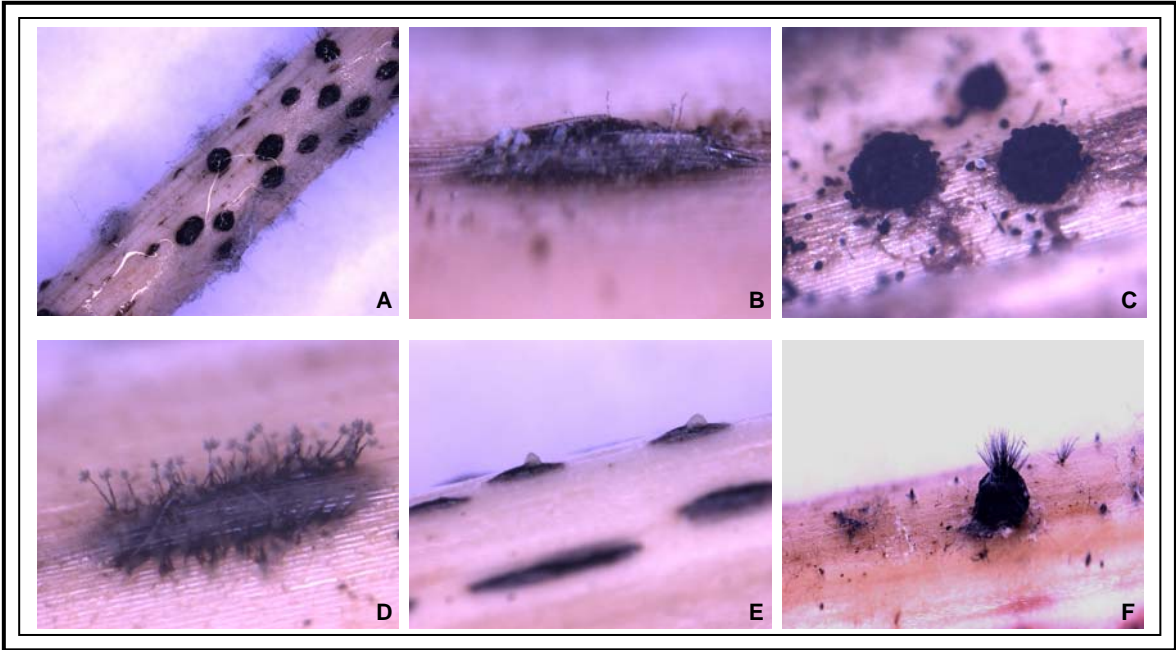


Figura 27. Fructificaciones encontradas en tallos secos de *Dactylis glomerata*. **A.** Tallo seco hidratado de *Dactylis glomerata* con fructificaciones de hongos. **B.** Esporodoquio de *Fusarium poae*. **C.** Fructificaciones de *Epicoccum nigrum*. **D.** Fructificaciones de *Cladosporium* sp. **E.** Picnidio con esclerocio. **F.** Picnidio con setas de *Colletotrichum acutatum*.

Tabla 7. Hongos aislados de bordes de lesiones de plantas enfermas y de fructificaciones de tallos secos de *Dactylis*.

HONGOS AISLADOS DE LESIONES		HONGOS AISLADOS DE TALLOS SECOS
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Glomerella graminicola</i> **	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Ampelomyces humuli</i>	<i>Helgardia</i> sp.	<i>Ampelomyces humuli</i>
<i>Cercospora</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp.*	<i>Colletotrichum acutatum</i> *
<i>Colletotrichum acutatum</i> *	<i>Phaeosphaeria avenaria</i> *	<i>Dreschlera dactylidis</i> **
<i>Colletotrichum falcatum</i> *	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i> *	<i>Epicoccum</i> sp.
<i>Drechslera</i> sp.*	<i>Phoma</i> sp.*	<i>Epicoccum nigrum</i>
<i>Drechslera biseptata</i> **	<i>Phoma glomerata</i> *	<i>Fusarium lateritium</i> *
<i>Drechslera dactylidis</i> **	<i>Phoma exigua</i> *	<i>Fusarium poae</i> **
<i>Dothideales</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Hypocrea</i> sp.
<i>Embellisia eureka</i>	<i>Rhexoscerosporidium</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp.*
<i>Epichloë typhina</i> **	<i>Septoria passerinii</i> *	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i> *
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Stagonospora arenaria</i> **	<i>Phomopsis</i> sp.
<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Stemphylium solani</i>	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>
<i>Fusarium lateritium</i> *	<i>Torruibiella confragosa</i>	
<i>Fusarium poae</i> **		

Nota. Género* o especie** que aparece en la lista de patógenos de *Dactylis* recopilada por Farr et al. (1989).

4.1.4. Abundancia y diversidad biológica.

El 89,5% de las especies identificadas fueron Ascomycetes; sólo se aislaron 10 especies de Basidiomycetes y 2 de Zygomycetes (Tabla 6). Los Ascomycetes identificados se agruparon en 52 géneros pertenecientes a 25 familias y 14 órdenes, los Basidiomycetes se agruparon en 7 órdenes y 6 familias y los Zygomycetes en 2 órdenes y 2 familias (Tabla 8).

Los géneros más abundantes en términos del número de aislados obtenidos fueron: *Penicillium* (34 aislados), *Cladosporium* (21), *Acremonium* (20), *Helgardia* (18), *Podospora* (18), *Fusarium* (17), *Phaeosphaeria* (17), *Epicoccum* (15), *Alternaria* (14), y *Drechslera* (12) (Figura 28). Estos 10 géneros, con más de 10 aislados cada uno, representan el 59% del total de aislados obtenidos, pero únicamente el 28,9% de las especies identificadas.

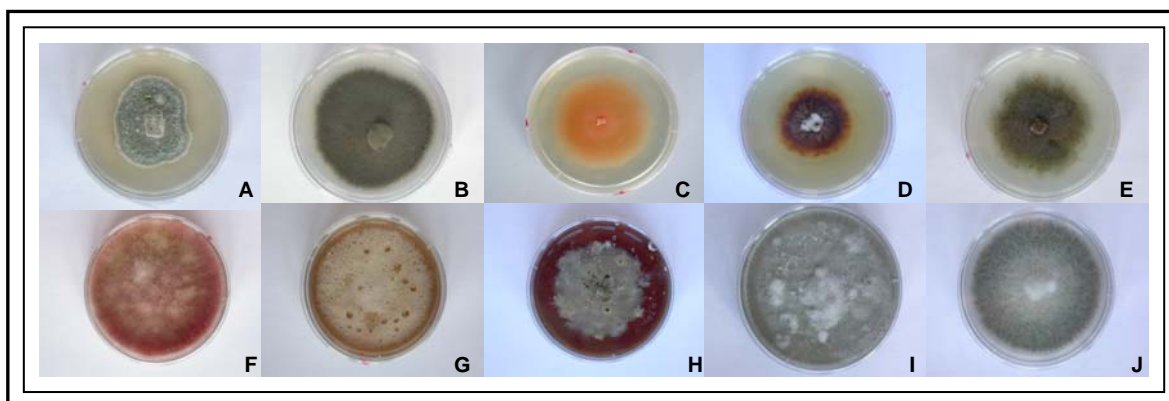


Figura 28. Cultivos en PDA de los géneros más abundantes aislados de plantas de *Dactylis glomerata*. A. *Penicillium*. B. *Cladosporium*. C. *Acremonium*. D. *Helgardia*. E. *Podospora*. F. *Fusarium*. G. *Phaeosphaeria*. H. *Epicoccum*. I. *Alternaria*. J. *Drechslera*.

Respecto a la abundancia de individuos de cada especie, 74 especies fueron únicas, representadas por un solo aislado, y 40 especies fueron plurales, representadas por más de un aislado.

Tabla 8. Órdenes, familias, y nº de géneros y especies identificados en la micobiota endofítica aislada de *Dactylis glomerata*.

PHYLUM/Orden/Familia	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES	PHYLUM/Orden/Familia	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES
ASCOMYCOTA			BASIDIOMYCOTA		
Capnodiales			Agaricales		
<i>Davidiellaceae</i>	2	3	<i>Mycenaceae</i>	1	1
Chaetosphaeriales			Corticiales		
<i>Chaetosphaeriaceae</i>	2	2	<i>Corticaceae</i>	1	1
Coniochaetales			Cystofilobasidiales		
<i>Coniochaetaceae</i>	1	1	<i>Cystofilobasidiaceae</i>	1	1
Diaporthales			Polyporales		
<i>Togniniaceae</i>	1	1	<i>Polyporaceae</i>	1	1
<i>Valsaceae</i>	3	4	Sporidiobolales		
Dothideales			Incertae sedis	1	2
<i>Dothioraceae</i>	1	1	Tremellales		
Eurotiales			<i>Tremellaceae</i>	1	2
<i>Trichocomaceae</i>	6	13	Ustilaginales		
Helotiales			<i>Ustilaginaceae</i>	1	1
<i>Helotiaceae</i>	1	1	Desconocidos	1	1
<i>Hyaloscyphaceae</i>	2	2	Total	7	10
Incertae sedis	2	2	ZYGOMYCOTA		
Hypocreales			Mucorales		
<i>Clavicipitaceae</i>	1	1	<i>Cunninghamellaceae</i>	1	1
<i>Cordycipitaceae</i>	3	3	Mortierellales		
<i>Hypocreaceae</i>	1	1	<i>Mortierellaceae</i>	1	1
<i>Nectriaceae</i>	1	5	Total	2	2
Incertae sedis	1	3	TOTAL	61	114
Onygenales					
<i>Onygenaceae</i>	1	1			
Phyllachorales					
<i>Phyllachoraceae</i>	1	1			
Pleosporales					
<i>Leptosphaeriaceae</i>	2	2			
<i>Phaeosphaeriaceae</i>	2	7			
<i>Pleosporaceae</i>	6	10			
Incertae sedis	3	4			
Sordariales					
<i>Chaetomiaceae</i>	1	3			
<i>Lasiophaeriaceae</i>	1	5			
<i>Sordariaceae</i>	1	1			
Trichosphaeriales					
Incertae sedis	1	1			
Xylariales					
<i>Xylariaceae</i>	1	1			
Incertae sedis	1	1			
Incertae sedis					
<i>Apiosporaceae</i>	1	3			
<i>Myxotrichaceae</i>	1	1			
<i>Pseudeurotiaceae</i>	1	1			
Desconocidos	1	17			
Total	52	102			

La curva no asintótica de acumulación de especies obtenida con los datos de todas las especies (Figura 29, curva azul) sugiere que incrementando el número de plantas analizadas aumentaría el número de nuevas especies. Sin embargo, cuando la curva de acumulación de especies se realiza sólo con los datos de las especies plurales, la curva se acerca a un crecimiento asintótico (Figura 29, curva roja). Por otra parte, la curva de acumulación de especies para las especies únicas (Figura 29, curva verde) tiene un crecimiento no asintótico, similar al obtenido para el total de especies.

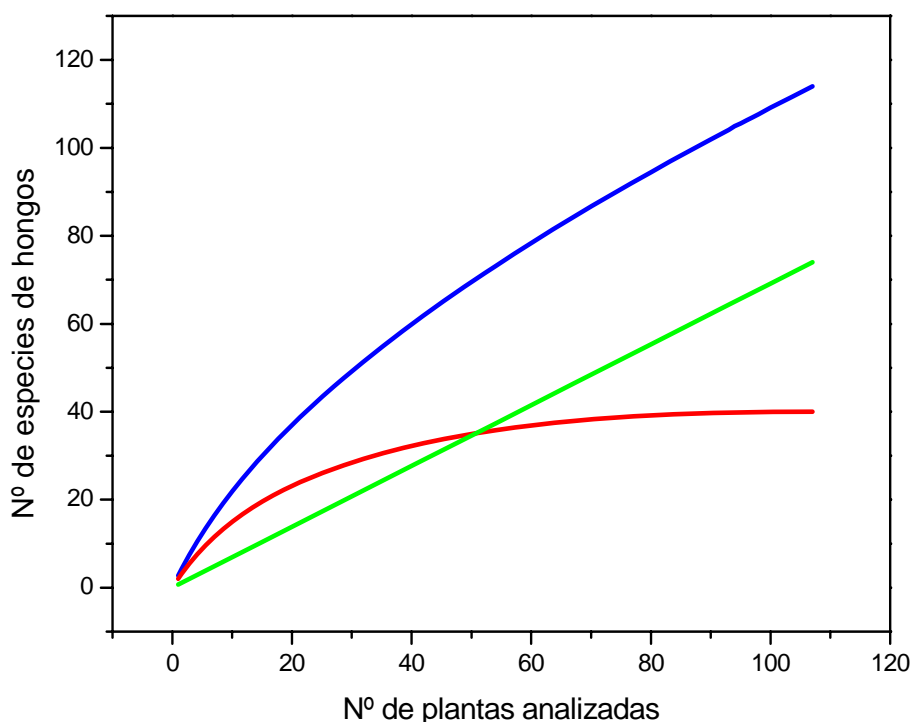


Figura 29. Curvas de acumulación de especies identificadas en *Dactylis glomerata*, que muestran la relación entre el nº de plantas analizadas y el nº total de especies de hongos encontrados (curva azul). La curva para las especies únicas (curva verde) fue realizada con los datos de las especies representadas por un aislado y la curva para las especies plurales (curva roja), por las especies representadas por más de un aislado.

Todos los estimadores utilizados produjeron curvas no asintóticas de acumulación de especies (Figura 30), lo cual implica que los valores de los estimadores deben ser interpretados como el número mínimo de especies que podrían estar asociadas a *Dactylis glomerata* (Gotelli y Colwell, 2001). Los valores de los estimadores de la riqueza total de especies varían entre 143 (estimador Bootstrap) y 337 (estimador Chao 2) (Tabla 9).

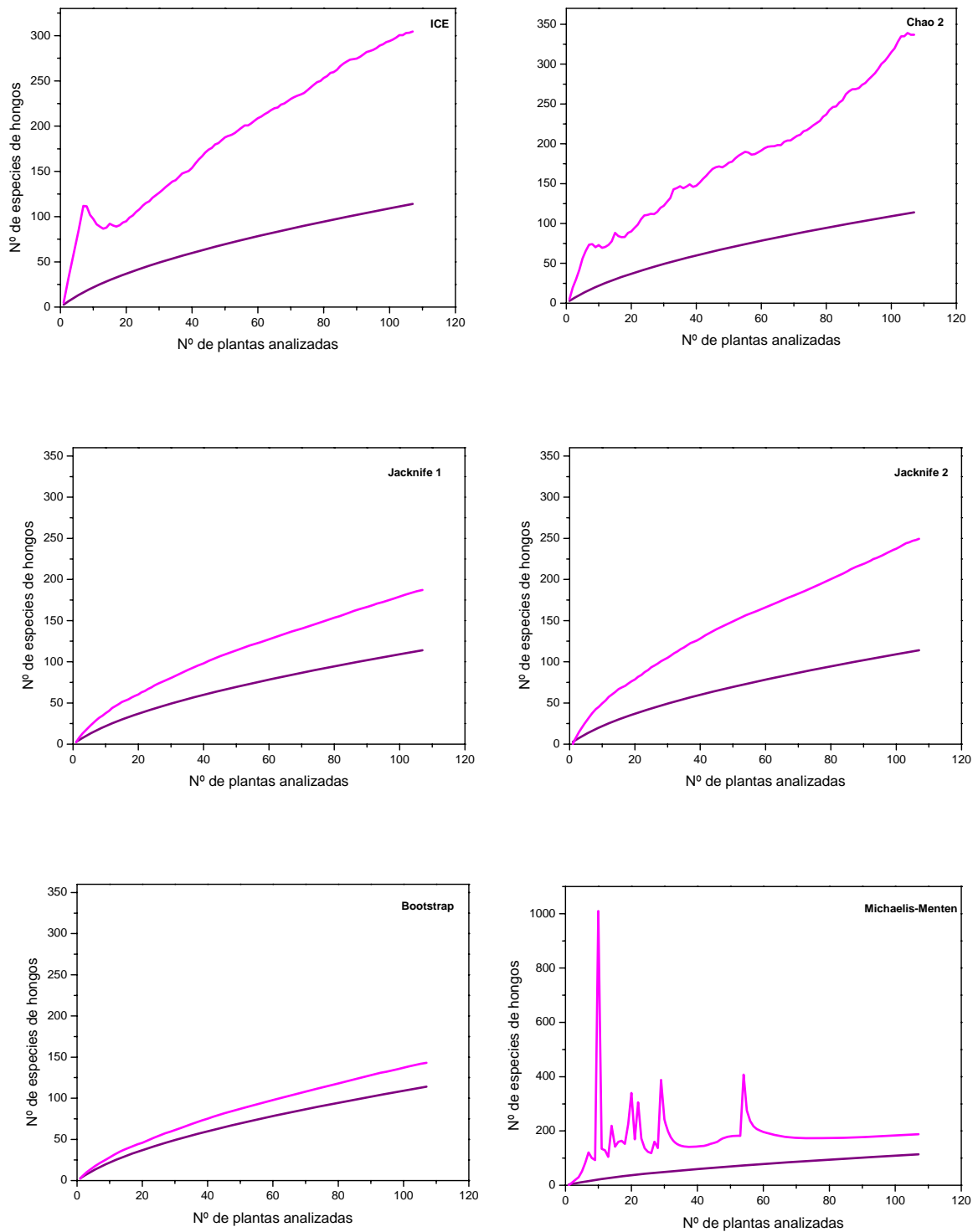


Figura 30. Valores de varios estimadores no paramétricos de la riqueza total de especies (ICE, Chao 2, Jackknife 1 y 2, Bootstrap, Michaelis-Menten; curvas cian) obtenidos a partir de los valores reales mostrados en las curvas de acumulación de especies (en azul) de la micobiota endofita de *Dactylis glomerata*.

Tabla 9. Valores de los estimadores del número total de especies de endofitos asociadas a *Dactylis glomerata*.

ESTIMADORES	Nº TOTAL DE ESPECIES
ICE	304,52
Chao 2	336,98
Jackknife 1	187,31
Jackknife 2	249,23
Bootstrap	143,12
Michaelis-Menten	187.81

El valor del índice de diversidad de Shannon es igual a 4,2 cuando consideramos a las 114 especies identificadas, y a 3,4 cuando lo calculamos para el subconjunto de especies plurales, representadas por más de un aislado.

4.1.5. Discusión.

En los estudios donde se utilizan secuencias de ITS para obtener una identificación, las secuencias son normalmente obtenidas por secuenciación de las 2 cadenas complementarias del replicón de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (Guo *et al.*, 2000, Wirsal *et al.*, 2001). En este estudio, las secuencias nucleotídicas fueron obtenidas solo de una cadena, en una reacción iniciada por el oligonucleótido ITS4, en el extremo 5' del ITS1. Como se muestra en la tabla 4, en las secuencias nucleotídicas obtenidas por este método se perdía información de aproximadamente el 10% del extremo 3' del ITS2. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en la base de datos EMBL con la secuencia total y la parcial, la secuencia parcial fue igual de efectiva que la completa para la identificación de aislados (Tabla 5). Otra evidencia del valor de las secuencias parciales la aporta la perfecta concordancia observada a nivel de género entre la identificación morfológica y molecular, para aquellos aislados cuya identidad en la base de datos fue mayor del 95% (Tabla 6). Por lo tanto, aunque podrían no ser adecuadas para un análisis filogenético riguroso, las secuencias parciales si son útiles para identificaciones en trabajos donde un gran número de aislados deben ser procesados.

En esta investigación, 96 especies diferentes de hongos endofíticos, pertenecientes a 63 géneros, fueron identificadas (Tablas 6 y 8); dieciocho especies adicionales, que

representan el 16,5% del total de las especies, no pudieron ser identificadas a nivel de género por ser estériles, y su secuencia ITS no corresponder a ninguna especie identificada en la base de datos EMBL/Genbank (Tabla 6, final de la tabla). Es posible que alguno de estos hongos sin identificar pertenezca a alguna especie conocida cuya secuencia de ITS no esté incluida en la base de datos. Sin embargo, otras especies sin identificar podrían ser realmente desconocidas. Estos resultados abogan en favor del potencial que albergan los ecosistemas endofíticos para contener algunas de las numerosas especies de hongos aún desconocidas (Hawksworth y Rossman, 1997; Fröhlich y Hyde, 1999).

En términos de abundancia de aislados, la micobiota identificada en *Dactylis* está compuesta de 70 especies únicas y 39 plurales. Dentro del conjunto de especies plurales hay un pequeño grupo de taxones dominantes (*Cladosporium* sp., *Helgardia* sp., *Acremonium strictum*, *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Podospora* sp., *Phaeosphaeria* sp.) que proporcionan más de la mitad del total de los aislados.

La forma no asintótica de la curva de acumulación de especies sugiere que incrementando el número de plantas analizadas, aumentaría el número de nuevas especies de endofitos (Figura 29, curva azul). Sin embargo, la tendencia a una curva asintótica observada para las especies plurales (Figura 29, curva roja) sugiere que en este estudio han sido aisladas la mayoría de las especies comunes de *Dactylis glomerata*. En contraste, la curva de acumulación de especies para las especies únicas (Figura 29, curva verde) es parecida a la curva para el total de especies, mostrando una relación directa entre el número de plantas analizadas y el de especies de hongos. Este análisis de las curvas de acumulación de especies sugiere que muestreando más plantas de *Dactylis glomerata* aumentaría el rendimiento del número de especies, y lo más probable es que las nuevas especies fuesen únicas.

El valor del índice de diversidad de Shannon obtenido ($H' = 4,2$) es mayor a los observados en otros estudios realizados sobre endofitos de gramíneas: *Hyparrhenia hirta* ($H' = 3,08$ y $3,33$) y *Bothriochloa macra* ($H' = 3,20$ y $3,40$) (White y Backhouse, 2007), *Phragmites australis* ($H' = 0,9-3,8$) (Neubert *et al.*, 2006), y que en estudios con otras familias de plantas herbáceas: *Tripterygium wilfordii* ($H' = 1,26-2,99$) (Kumar y Hyde, 2004); *Dryas integrifolia* ($H' = 2,69-2,99$) (Higgins *et al.*, 2006), o en árboles, como

Guarea guidonia, con H' entre 2,25 y 2,90 (Gamboa y Bayman, 2001) o *Pinus taeda*, con H' entre 0,55 y 2,13 (Arnold *et al.*, 2007). Este resultado nos sugiere que, a pesar de su tamaño, *Dactylis glomerata* representa un ecosistema rico en micobiota endofítica.

La estimación más alta de la riqueza total de especies la da el estimador Chao 2, con 337 especies, y la más baja el estimador Bootstrap, con 142,89 (Tabla 9). A causa de la relativamente alta y constante proporción de especies singulares, las curvas producidas por los estimadores fueron no asintóticas. Por lo tanto, los valores obtenidos deben ser interpretados como los límites inferiores de la riqueza total de especies (Gotelli y Colwell, 2001). Además, el conjunto de endofitos asociados a *Dactylis* debería ser mayor del observado, debido a algunas restricciones técnicas que limitan el número de endofitos aislados e identificados; por ejemplo, algunas especies podrían no crecer en los medios de cultivo usados, y además, los biotrofos obligados no pueden ser aislados en cultivo. No obstante, existen métodos útiles para identificar endofitos no cultivables (Neubert *et al.*, 2006).

Considerando el elevado número de endofitos identificados, y la forma de la curva de acumulación de especies totales de esta gramínea, si la riqueza de especies de la micobiota endofítica estuviera correlacionada positivamente con el tamaño de la planta hospedadora, algunos estudios de especies de endofitos en árboles y arbustos probablemente infravalorarían el número de especies endofíticas, como por ejemplo 149 especies identificadas en *Quercus ilex* (Collado *et al.*, 1999), a las 242 especies identificadas en *Heisteria concinna* (Arnold *et al.*, 2000). Este déficit puede ser debido a la identificación exclusivamente morfológica que se utilizó en algunos estudios anteriores, que no permitió la identificación de aislados estériles.

Webster (1956, 1957) estudió los hongos que van apareciendo en tallos senescentes de *Dactylis*. Las primeras especies documentadas en tallos maduros fueron *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum purpurascens*, *Alternaria tenuis*, *Leptosphaeria microscopica* (= *Phaeosphaeria microscopica*), y *Pleospora vagans* (= *Phaeosphaeria vagans*). Todas estas especies pertenecen a géneros que en este estudio se han aislado con frecuencia. Quizás, estos primeros colonizadores de tallos en descomposición estaban ya presentes en las plantas vivas como endofitos, siendo saprofitos latentes que crecen después en tallos

senescentes. En este trabajo también se han aislado de tallos secos hongos como *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. o *Epicoccum* sp., que pertenecen a algunos géneros de saprofitos descritos por Webster (Tabla 7).

La lista más extensa de hongos identificados en *D. glomerata* es una recopilación de patógenos realizada por Farr *et al.* (1989) en la cual fueron catalogadas 68 especies de hongos pertenecientes a 41 géneros. Sólo 10 géneros son comunes entre esta compilación y los identificados en nuestro estudio: *Ascochyta*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Epichloë*, *Fusarium*, *Periconia*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Stagonospora* y *Ustilago* (Figura 31). Es probable que algunos de nuestros aislados de estos géneros fuesen patógenos débiles o latentes de *Dactylis*, hipótesis apoyada por el hecho de que, excepto para *Periconia*, las especies de todos los géneros anteriores fueron también aislados de lesiones de plantas enfermas (Tabla 7). La mayoría de las especies aisladas de tejido enfermo (Tabla 7) son patógenos de gramíneas (Mathre, 1982; Wiese, 1987; Farr *et al.*, 1989). Sin embargo, la mayoría de estas especies fueron también aisladas de plantas sanas (Tabla 6). Por lo tanto, estos hongos aislados de plantas sanas, así como de lesiones, pueden representar un grupo de patógenos latentes, como se ha visto en otros estudios (Photita *et al.*, 2004).

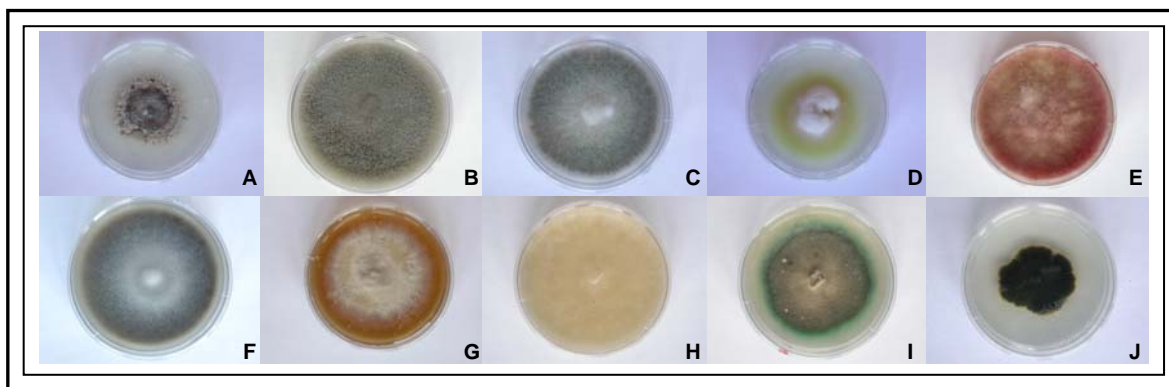


Figura 31. Cultivos en PDA de géneros aislados en el estudio conocidos como patógenos de *Dactylis glomerata* (Farr *et al.*, 1989). **A.** *Ascochyta*. **B.** *Colletotrichum*. **C.** *Drechslera*. **D.** *Epichloë*. **E.** *Fusarium*. **F.** *Periconia*. **G.** *Phaeosphaeria*. **H.** *Phoma*. **I.** *Stagonospora*. **J.** *Ustilago*.

Varios géneros de potenciales patógenos de cultivos como trigo o cebada, fueron aislados de plantas asintomáticas de *Dactylis*. En estos cereales, *Acremonium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Laetisaria*, *Leptosphaeria*, *Microdochium*, *Phoma*, *Stagonospora*,

Trichoderma, *Ulocladium* y *Ustilago* están asociados a varias enfermedades (Mathre, 1982; Wiese, 1987, Farr *et al.*, 1989). Algunos de los géneros anteriores, como *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, y *Fusarium*, fueron aislados con frecuencia como endofitos de *Dactylis* (Figura 32). Además, *Helgardia* sp., un patógeno asociado a una enfermedad foliar en cereales (Crous *et al.*, 2003) fue uno de los endofitos más abundantes de *Dactylis*; 18 aislados de *Helgardia* sp. fueron obtenidos de plantas de La Coruña, 5 en Salamanca, y 1 en Ávila. *Helgardia* podría ser un patógeno de *Dactylis*, porque fue también aislado de hojas con lesiones de plantas con síntomas visibles de enfermedad (Tabla 7). Los resultados anteriores implican que *D. glomerata*, una especie de gramínea común en España, podría actuar como un hospedador alternativo y un reservorio de patógenos potenciales de cultivos de cereales.

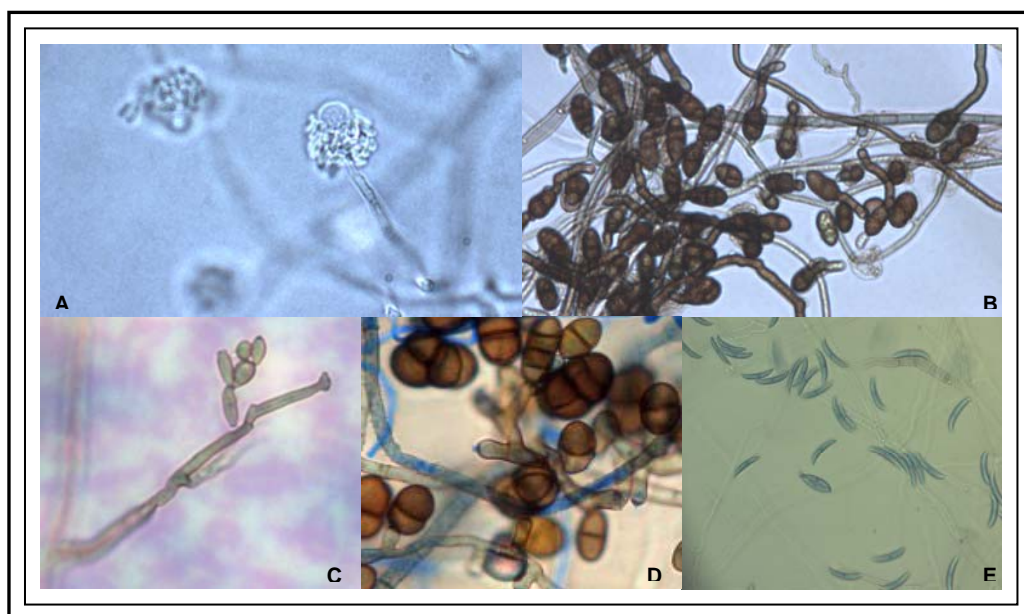


Figura 32. Fotografías a microscopía óptica de los géneros más frecuentemente aislados de *Dactylis glomerata* (Farr *et al.*, 1989). **A.** *Acremonium*. **B.** *Alternaria*. **C.** *Cladosporium*. **D.** *Epicoccum*. **E.** *Fusarium*.

El grupo de Ascomycetes es la micobiota predominante en *Dactylis*. Géneros como *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phomopsis*, y *Stagonospora*, fueron frecuentemente aislados como endofitos de *Dactylis glomerata* y de otras especies de plantas (Bills, 1996; Stone *et al.*, 2004; Schulz y Boyle, 2005). A pesar de que la micobiota predominante en la mayoría de los trabajos sobre endofitos sean los Ascomycetes (Stone *et al.*, 2004; Duong *et al.*, 2006;

Ganley y Newcombe, 2006; Morakotkarn *et al.*, 2006; Pinnoi *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2006), existe alguna excepción en la que prevalecen los Basidiomycetes (Crozier *et al.*, 2006).

Por otra parte, en el grupo de 21 taxones que han podido ser identificados a nivel de especie, al menos 5 parecen ser específicos de gramíneas: *Drechslera dactylidis*, *Epichloë typhina*, *Periconia macrospinoso*, *Phaeosphaeria avenaria* y *Stagonospora arenaria* (Figura 33). Estas especies no han sido descritas en hospedadores de otras familias de plantas (Farr *et al.*, 1989). Algunos de los endofitos descritos en otras gramíneas como *Phragmites australis* (Wirsel *et al.*, 2001) o bambú (Morakotkarn *et al.*, 2006), fueron también aislados de *Dactylis*. En contraste, el conjunto de endofitos de *Dactylis* es bastante diferente que el de plantas leñosas perennes. Fuera del grupo de 68 géneros descritos como endofitos de hojas de leñosas perennes, sólo 10 géneros estuvieron presentes en *Dactylis* (Stone *et al.*, 2004).

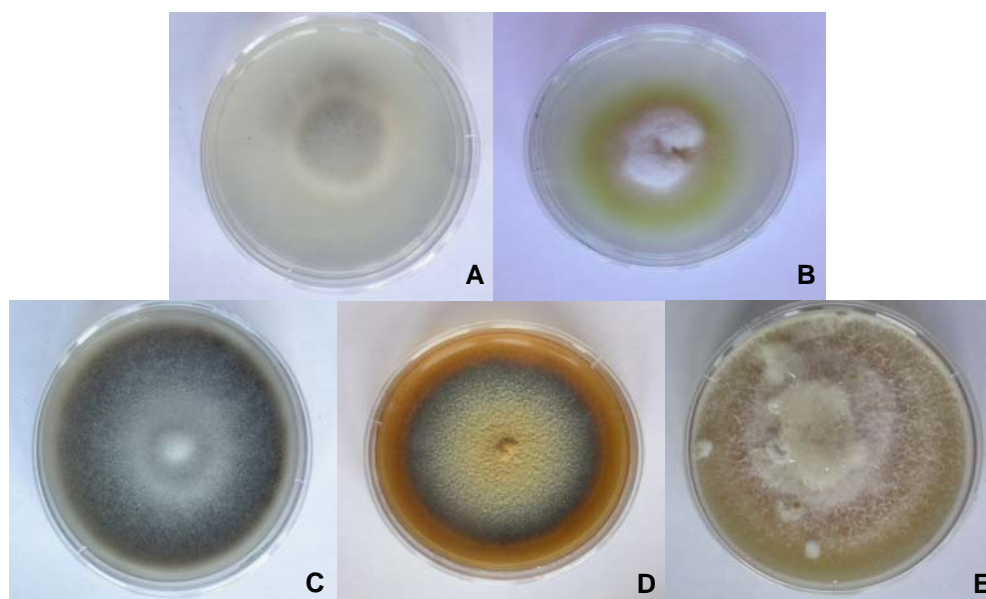


Figura 33. Cultivos en PDA de las especies aisladas de *Dactylis glomerata* y que ya eran conocidas como especies específicas de gramíneas. **A.** *Drechslera dactylidis*. **B.** *Epichloë typhina*. **C.** *Periconia macrospinoso*. **D.** *Phaeosphaeria avenaria*. **E.** *Stagonospora arenaria*.

Este estudio demuestra que una pequeña planta herbácea puede ser considerada un ecosistema que contiene una gran riqueza endofítica. Esta microbiota está compuesta de especies plurales comúnmente asociadas con el hospedador, incluyendo varios posibles patógenos latentes, y de un predominio de especies únicas.

4.2. MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE *Holcus lanatus*.

4.2.1. Aislamiento de endofitos.

El muestreo de *Holcus lanatus* se realizó en 28 localidades pertenecientes a las provincias de Cáceres, La Coruña, Oviedo, Salamanca y Zamora (Tabla 10). En cada localidad se recogieron 7 plantas, realizándose el aislamiento de endofitos de hojas con las 196 plantas muestreadas en las 28 localidades y el de raíces con un subconjunto de 77 plantas pertenecientes a 11 localidades (Tabla 10).

Tabla 10. Localidades donde se recogieron plantas de *Holcus lanatus*, indicando en cada localidad el número de aislados y de especies identificadas de hojas (H), de raíces (R), y el total (T).

LOCALIDADES	Nº AISLADOS IDENTIFICADOS			Nº ESPECIES IDENTIFICADAS		
	H	R	T	H	R	T**
Aldeanueva del Camino. CC	22	10	32	16	8	21
Asegur, río Hurdano. CC	12	-	12	8	-	8
Cabezo, CC	20	-	20	15	-	15
Camino rural, Hervás. CC	19	-	19	10	-	10
Casas del Monte, zona A. CC	9	5	14	7	5	11
Casas del Monte, zona B. CC	20	20	40	16	19	30
Castañar gallego. Puerto Honduras. CC	13	-	13	9	-	9
Cerezal, CC	24	-	24	9	-	9
Convento San José de Batuecas. SA	18	-	18	15	-	15
Cordobelas, CO	34	-	34	22	-	22
Cristo de la Salud. Puerto Honduras. CC	15	-	15	11	-	11
Fragosa, río Hurdano, zona norte. CC	18	-	18	12	-	12
Fragosa, río Hurdano, zona sur. CC	14	-	14	7	-	7
Garganta del Infierno, CC	19	4	23	12	4	16
Jerte, CC	18	11	29	14	9	21
Jerte, río Jerte. CC	16	14	30	14	12	23
Las Caldas, OV	32	25	57	21	19	35
Granja de Moreuella, zona A. ZA	19	-	19	10	-	10
Granja de Moreuella, zona B. ZA	20	-	20	13	-	13
Montemayor del Río, SA	36	-	36	27	-	27
Moreuella de los Infanzones, ZA	18	22	40	10	19	26
Plasencia, río Jerte. CC	14	7	21	9	7	15
Puerto de Honduras. Valle del Jerte. CC	9	7	16	8	5	13
Ruta Heidi, Puerto de Honduras. CC	7	-	7	6	-	6
Tábara. Zona A. ZA	12	-	12	8	-	8
Tábara. Zona B. ZA	22	-	22	13	-	13
Tábara. Zona C. ZA	10	-	10	6	-	6
Torres del Carrizal, ZA	22	24	46	9	21	28
TOTAL	512	149	661	157*	79*	208
MEDIA por localidad	18,29	13,55	23,61	5,61	7,18	7,43
MEDIA por planta	2,61	1,94	3,37	0,80	1,03	1,06

Nota. ^aLocalidades de las provincias de CC: Cáceres, CO: La Coruña, OV: Oviedo, SA: Salamanca, ZA: Zamora. * Los totales no se corresponde con la suma de las filas anteriores debido a que hay especies aisladas de hojas o raíces comunes a varias localidades. ** El total no se corresponde con la suma de las filas anteriores debido a que hay especies comunes a hojas y raíces.

4.2.2. Identificación de los aislados.

Se obtuvieron secuencias completas de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 de 470 aislados, 351 de hojas y 119 de raíces. Al agrupar dentro de la misma especie las secuencias que difirieron en menos del 3%, se identificaron 147 especies distintas de endofitos de hojas (Figura 34 y 35) y 68 especies de raíz (Figura 36). A estas especies identificadas en base a sus caracteres moleculares y siempre que fue posible también morfológicos, hay que añadir 10 taxones de hoja y 11 de raíz que fueron identificados únicamente mediante caracteres morfológicos. En todos los casos en que la identificación fue morfológica y molecular, hubo concordancia en los resultados. Por lo tanto, son 157 las especies identificadas en hojas y 79 las identificadas en raíces (Tabla 11). Teniendo en cuenta que 28 especies fueron aisladas de ambos órganos, el número total de especies endofíticas identificadas en esta gramínea es de 208.

El total de especies identificadas abarca 89 géneros agrupados en 41 familias y 26 órdenes (Tabla 12). De las 157 especies identificadas en hojas, 143 resultaron ser Ascomycetes (Figura 35), y 14 Basidiomycetes (Figura 34). En el caso de las 79 especies de endofitos de raíces (Figura 36), se identificaron 75 Ascomycetes, 2 Basidiomycetes (*Ceratobasidium* sp. y *Cryptococcus podzolicus*), y 2 Zygomycetes (*Mortierella* sp. y *Mucor hiemalis*). Del total de especies identificadas, 190 fueron Ascomycetes, 16 Basidiomycetes y 2 Zygomycetes.

Treinta especies de hoja y 26 de raíz no pudieron ser identificadas a nivel de orden, género o especie, por ser estériles y no ser su secuencia similar (mayor del 95%) a la de algún hongo identificado en la base de secuencias EMBL/GenBank. Sin embargo, todas estas especies pudieron ser clasificadas como Ascomycetes tras su alineamiento con las secuencias de todas las demás especies identificadas (Figuras 35 y 36).

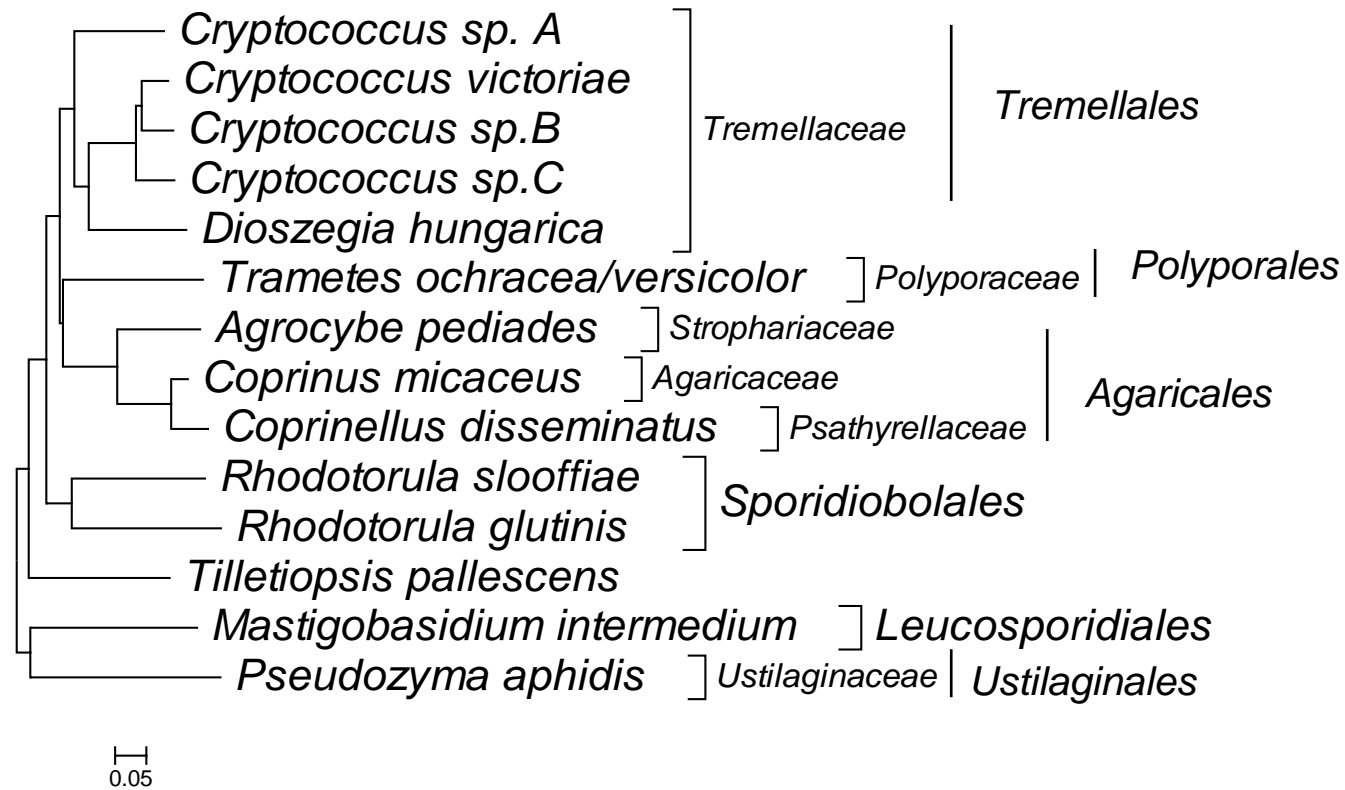


Figura 34. Dendrograma elaborado con las secuencias de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de las especies de Basidiomycetes aisladas e identificadas molecularmente de hojas de *Holcus lanatus* y realizado con el método Neighbour-Joining, con la distancia genética calculada según el método Kimura 2-parámetros. Los corchetes indican familias y las líneas verticales órdenes. La barra de escala (0,05) significa 5 sustituciones cada 100 nucleótidos.

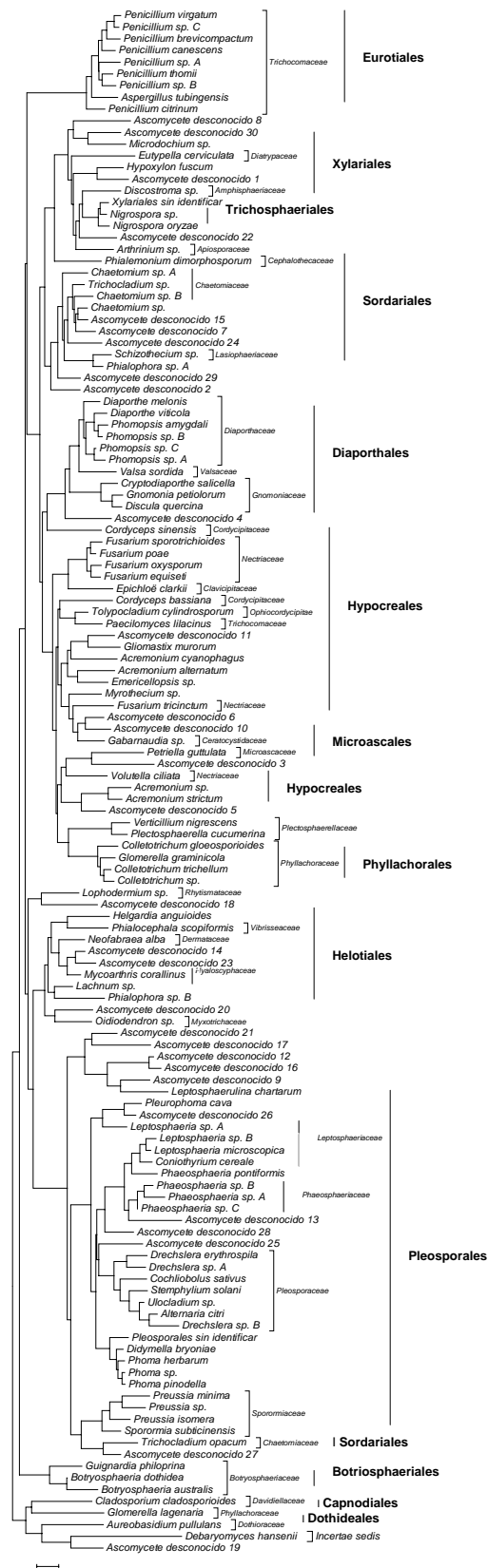


Figura 35. Dendrograma elaborado con las secuencias de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de las especies de Ascomycetes aisladas e identificadas molecularmente de hojas de *Holcus lanatus*, utilizando el método Neighbour-Joining, con la distancia genética calculada según el método Kimura 2- parámetros. Los corchetes indican familias y las líneas verticales órdenes. La barra de escala (0,05) significa 5 sustituciones cada 100 nucleótidos.

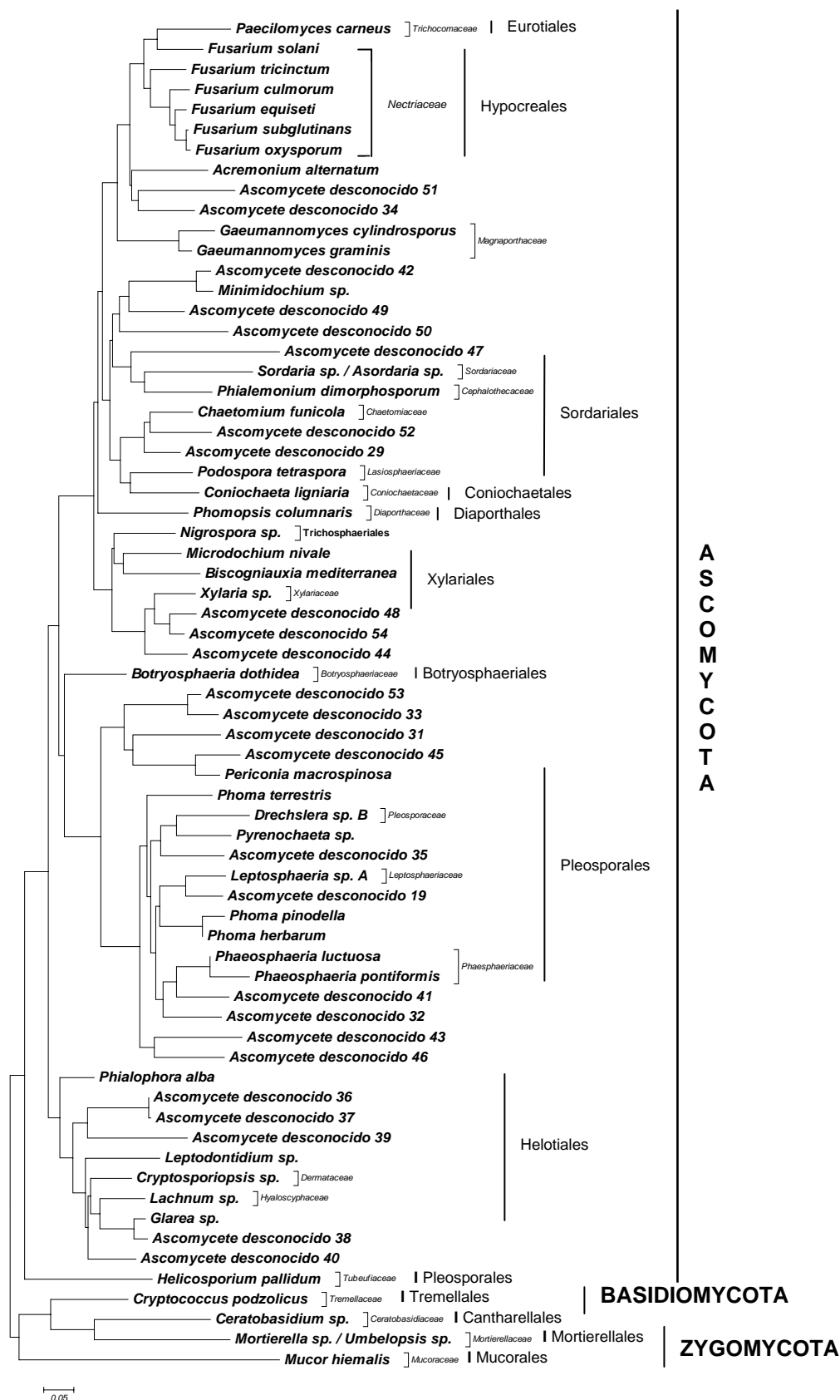


Figura 36. Dendrograma elaborado con las secuencias de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 de las especies aisladas e identificadas molecularmente, de raíces de *Holcus lanatus*, utilizando el método Neighbour-Joining, con la distancia genética calculada según el método Kimura 2-parameter. Los corchetes indican familias y las líneas verticales órdenes y phylum. La barra de escala (0,05) significa 5 sustituciones cada 100 nucleótidos.

Tabla 11. Especies de endofitos identificadas en 196 muestras de hojas y en 77 muestras de raíces de *Holcus lanatus*.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
2011	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria arborescens</i> ^a	100,00	<i>Alternaria</i> sp. *	82	9	91
2001	<i>Cladosporium</i> sp.	n.s.	-	<i>Cladosporium</i> sp. *	64	3	67
2193	<i>Penicillium</i> sp.	n.s.	-	<i>Penicillium</i> sp. *	29	8	37
2045	<i>Epicoccum</i> sp.	n.s.	-	<i>Epicoccum</i> sp. *	28	5	33
3223	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100,00	<i>Aureobasidium pullulans</i> *	27	0	27
2384	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	99,14	<i>Acremonium</i> sp. *	13	9	22
2065	<i>Podospora</i> sp.	n.s.	-	<i>Podospora</i> sp. *	8	7	15
3117	<i>Curvularia inaequalis</i>	n.s.	-	<i>Curvularia inaequalis</i> *	9	5	14
2795	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	99,82	<i>Arthrinium</i> sp. *	12	1	13
3200	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100,00	<i>Aspergillus tubingensis</i> *	7	3	10
2439	<i>Drechslera</i> sp.	n.s.	-	<i>Drechslera</i> sp. *	10	0	10
2151	<i>Phialemonium</i> sp.	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	99,06	<i>Phialemonium dimorphosporum</i> *	7	1	8
3130	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium globosum</i>	100,00	<i>Chaetomium globosum</i> *	7	0	7
2403	<i>Chaetomium</i> sp.	n.s.	-	<i>Chaetomium</i> sp. *	7	0	7
2829	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	90,73	Ascomycete desconocido 1	7	0	7
2476	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,81	<i>Fusarium oxysporum</i> *	2	4	6
3449	<i>Drechslera</i> sp.	<i>Drechslera</i> sp.	98,19	<i>Drechslera</i> sp. B *	1	4	5
2009	<i>Microdochium</i> sp.	<i>Microdochium</i> sp.	95,33	<i>Microdochium</i> sp. *	2	3	5
2814	Levadura sin identificar	<i>Cryptococcus victoriae</i>	99,80	<i>Cryptococcus victoriae</i>	4	0	4
3475	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Diaporthe viticola</i>	100,00	<i>Diaporthe viticola</i> *	4	0	4
3288	<i>Epichloë</i> sp.	<i>Epichloë baconii</i>	98,26	<i>Epichloë clarkii</i> *	3	1	4
3674	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	98,87	<i>Fusarium sporotrichioides</i> *	4	0	4
2010	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium tricinctum</i>	99,63	<i>Fusarium tricinctum</i>	1	3	4
3435	<i>Leptodontidium</i> sp.	<i>Leptodontidium</i> sp.	96,87	<i>Leptodontidium</i> sp.	0	4	4
3957	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora oryzae</i>	98,87	<i>Nigrospora oryzae</i> *	4	0	4
3465	<i>Periconia macrospinoso</i>	<i>Periconia macrospinoso</i>	99,40	<i>Periconia macrospinoso</i>	0	4	4
3326	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	96,14	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i> *	3	1	4
2400	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	n.s.	-	<i>Phaeosphaeria</i> sp. *	3	1	4
2475	<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Ulocladium</i> sp.	99,82	<i>Ulocladium</i> sp. *	4	0	4
2396	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium alternatum</i>	99,46	<i>Acremonium alternatum</i>	2	1	3
3148	<i>Acremonium cyanophagus</i>	<i>Acremonium cyanophagus</i>	99,81	<i>Acremonium cyanophagus</i> *	3	0	3
3939	<i>Chaetomium funicola</i>	<i>Chaetomium funicola</i>	98,37	<i>Chaetomium funicola</i>	0	3	3

Tabla 11. Continuación.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
2167	<i>Drechslera</i> sp.	<i>Drechslera</i> sp.	99,06	<i>Drechslera</i> sp. A	3	0	3
3653	<i>Emericellopsis</i> sp.	<i>Emericellopsis</i> sp.	97,49	<i>Emericellopsis</i> sp.	3	0	3
3358	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium equiseti</i>	100,00	<i>Fusarium equiseti</i> *	1	2	3
2027	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium poae</i>	100,00	<i>Fusarium poae</i>	3	0	3
3755	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	99,46	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	0	3	3
2816	Cultivo estéril	Hongo endofítico	98,09	Ascomycete desconocido 2	3	0	3
2823	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium strictum</i>	99,46	<i>Acremonium strictum</i>	2	0	2
3122	Cultivo estéril	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99,79	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1	1	2
3663	<i>Cochliobolus</i> sp.	<i>Cochliobolus sativus</i>	100,00	<i>Cochliobolus sativus</i>	2	0	2
2002	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	99,82	<i>Colletotrichum</i> sp. *	2	0	2
3836	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	99,64	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	0	2	2
2107	Cultivo estéril	<i>Coniothyrium cereale</i>	98,31	<i>Coniothyrium cereale</i>	2	0	2
3515	Cultivo estéril	<i>Coprinellus disseminatus</i>	98,80	<i>Coprinellus disseminatus</i> *	2	0	2
3155	<i>Cordyceps</i> sp.	<i>Cordyceps bassiana</i>	99,63	<i>Cordyceps bassiana</i>	2	0	2
3473	<i>Discula quercina</i>	<i>Discula quercina</i>	100,00	<i>Discula quercina</i> *	2	0	2
2020	<i>Fusarium</i> sp.	n.s.	-	<i>Fusarium</i> sp.	2	0	2
3263	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	99,63	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	0	2	2
2138	<i>Lachnum</i> sp.	<i>Lachnum</i> sp.	96,57	<i>Lachnum</i> sp.	1	1	2
2809	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp.	98,61	<i>Leptosphaeria</i> sp. A	1	1	2
2024	<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Myrothecium</i> sp.	95,74	<i>Myrothecium</i> sp.	2	0	2
3786	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora</i> sp.	95,69	<i>Nigrospora</i> sp. *	1	1	2
3153	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99,66	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2	0	2
2427	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium canescens</i>	100,00	<i>Penicillium canescens</i>	2	0	2
3350	Cultivo estéril	<i>Phoma herbarum</i>	98,81	<i>Phoma herbarum</i> *	1	1	2
2815	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma pinodella</i>	99,23	<i>Phoma pinodella</i>	1	1	2
3932	<i>Phomopsis columnaris</i>	<i>Phomopsis columnaris</i>	99,43	<i>Phomopsis columnaris</i>	0	2	2
3803	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	96,59	<i>Phomopsis</i> sp. C *	2	0	2
2050	<i>Pleosporales</i> sp.	<i>Pleosporales</i> sp.	95,59	<i>Pleosporales</i> sin identificar	2	0	2
2122	<i>Pseudozyma</i> sp.	<i>Pseudozyma aphidis</i>	99,04	<i>Pseudozyma aphidis</i>	2	0	2
3640	<i>Stemphylium</i> sp.	<i>Stemphylium solani</i>	100,00	<i>Stemphylium solani</i>	2	0	2
3316	<i>Trichocladium</i> sp.	<i>Trichocladium</i> sp.	96,89	<i>Trichocladium</i> sp. *	2	0	2
3709	<i>Valsa</i> sp.	<i>Valsa sordida</i>	99,48	<i>Valsa sordida</i>	2	0	2

Tabla 11. Continuación.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
3327	Cultivo estéril	<i>Scopulariopsis chartarum</i>	83,30	Ascomycete desconocido 3 *	2	0	2
3492	Cultivo estéril	<i>Sphaeronaemella fragariae</i>	93,00	Ascomycete desconocido 4 *	2	0	2
3351	Cultivo estéril	Hongo endofítico	94,09	Ascomycete desconocido 19 *	1	1	2
3844	Cultivo estéril	<i>Cercophora coprophila</i>	91,26	Ascomycete desconocido 29 *	1	1	2
3972	Cultivo estéril	Soil fungal sp.	98,88	Ascomycete desconocido 30 *	1	1	2
3211	Cultivo estéril	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	80,77	Ascomycete desconocido 31	0	2	2
3364	Cultivo estéril	Pleosporales sp.	91,43	Ascomycete desconocido 32	0	2	2
3891	Cultivo estéril	<i>Humicola fuscoatra</i>	87,11	Ascomycete desconocido 33	0	2	2
3936	Cultivo estéril	<i>Strattonia oblectyiformis</i>	84,44	Ascomycete desconocido 34	0	2	2
3967	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	83,45	Ascomycete desconocido 35	0	2	2
3268	Cultivo estéril	<i>Agrocybe pediades</i>	99,85	<i>Agrocybe pediades</i> *	1	0	1
2013	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria citri</i>	100,00	<i>Alternaria citri</i>	1	0	1
2105	<i>Aspergillus terreus</i>	n.s.	-	<i>Aspergillus terreus</i>	1	0	1
3961	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	99,81	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	0	1	1
2030	Cultivo estéril	<i>Botryosphaeria australis</i>	99,64	<i>Botryosphaeria australis</i>	1	0	1
3334	<i>Ceratobasidium</i> sp.	<i>Ceratobasidium</i> sp.	99,36	<i>Ceratobasidium</i> sp.	0	1	1
2145	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	93,66	<i>Chaetomium</i> sp. A	1	0	1
3258	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	99,82	<i>Chaetomium</i> sp. B *	1	0	1
2130	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99,82	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	0	1
2053	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99,83	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1	0	1
2818	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum trichellum</i>	99,64	<i>Colletotrichum trichellum</i>	1	0	1
3534	Cultivo estéril	<i>Coprinus micaceus</i>	99,55	<i>Coprinus micaceus</i> *	1	0	1
3495	<i>Cordyceps</i> sp.	<i>Cordyceps sinensis</i>	100,00	<i>Cordyceps sinensis</i> *	1	0	1
3422	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	99,39	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	0	1	1
2452	Levadura sin identificar	<i>Cryptococcus</i> sp.	99,10	<i>Cryptococcus</i> sp. A	1	0	1
2827	Levadura sin identificar	<i>Cryptococcus</i> sp.	99,80	<i>Cryptococcus</i> sp. B	1	0	1
2850	Levadura sin identificar	<i>Cryptococcus</i> sp.	98,17	<i>Cryptococcus</i> sp. C	1	0	1
3390	Cultivo estéril	<i>Cryptodiaporthe salicella</i>	100,00	<i>Cryptodiaporthe salicella</i>	1	0	1
3386	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	99,24	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	0	1	1
3242	<i>Debaryomyces hanseni</i>	<i>Debaryomyces hanseni</i>	99,84	<i>Debaryomyces hanseni</i> *	1	0	1
3802	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Diaporthe melonis</i>	99,62	<i>Diaporthe melonis</i> *	1	0	1
3357	<i>Didymella bryoniae</i>	<i>Didymella bryoniae</i>	98,63	<i>Didymella bryoniae</i> *	1	0	1

Tabla 11. Continuación.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
2798	<i>Dioszegia hungarica</i>	<i>Dioszegia hungarica</i>	99,15	<i>Dioszegia hungarica</i>	1	0	1
2455	<i>Discostroma</i> sp.	<i>Discostroma</i> sp.	95,01	<i>Discostroma</i> sp.	1	0	1
3747	<i>Drechslera</i> sp.	<i>Drechslera erythrospila</i>	99,82	<i>Drechslera erythrospila</i> *	1	0	1
3218	<i>Eutypella cerviculata</i>	<i>Eutypella cerviculata</i>	100,00	<i>Eutypella cerviculata</i> *	1	0	1
3873	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	99,81	<i>Fusarium culmorum</i>	0	1	1
3806	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>	100,00	<i>Fusarium solani</i>	0	1	1
3378	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>	100,00	<i>Fusarium subglutinans</i>	0	1	1
2436	<i>Garbarnaudia</i> sp.	<i>Sarcopodium</i> sp.	85,56	<i>Garbarnaudia</i> sp. ^b	1	0	1
3330	<i>Glarea</i> sp.	<i>Glarea lozoyensis</i>	96,6	<i>Glarea</i> sp.	0	1	1
2127	<i>Gliomastix murorum</i>	<i>Gliomastix murorum</i>	99,13	<i>Gliomastix murorum</i>	1	0	1
2460	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Glomerella graminicola</i>	99,46	<i>Glomerella graminicola</i>	1	0	1
3281	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Glomerella lagenaria</i>	98,05	<i>Glomerella lagenaria</i> *	1	0	1
3743	<i>Gnomonia petiolorum</i>	<i>Sirococcus conigenus</i>	89,67	<i>Gnomonia petiolorum</i> ^b *	1	0	1
2136	<i>Guignardia philoprina</i>	<i>Guignardia philoprina</i>	99,79	<i>Guignardia philoprina</i>	1	0	1
2838	<i>Helgardia</i> sp.	<i>Helgardia anguioides</i>	99,41	<i>Helgardia anguioides</i>	1	0	1
3486	<i>Helicosporium pallidum</i>	<i>Helicosporium pallidum</i>	98,90	<i>Helicosporium pallidum</i>	0	1	1
2796	<i>Hypoxylon fuscum</i>	<i>Hypoxylon fuscum</i>	99,64	<i>Hypoxylon fuscum</i>	1	0	1
3814	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	98,74	<i>Leptosphaeria microscopica</i> *	1	0	1
3813	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp.	96,75	<i>Leptosphaeria</i> sp. B *	1	0	1
1999	<i>Leptosphaerulina</i> sp.	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	100,00	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	1	0	1
3396	<i>Lophodermium</i> sp.	<i>Lophodermium</i> sp.	97,29	<i>Lophodermium</i> sp. *	1	0	1
2841	<i>Mastigobasidium</i> sp.	<i>Mastigobasidium intermedium</i>	98,11	<i>Mastigobasidium intermedium</i>	1	0	1
3585	<i>Microdochium nivale</i>	<i>Microdochium nivale</i>	99,25	<i>Microdochium nivale</i> ^b	0	1	1
3871	<i>Minimidochium</i> sp.	Hongo sin identificar	100,00	<i>Minimidochium</i> sp.	0	1	1
3584	<i>Mortierella</i> sp.	<i>Mortierella</i> sp.	99,44	<i>Mortierella</i> sp.	0	1	1
3322	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	99,35	<i>Mucor hiemalis</i>	0	1	1
2803	Cultivo estéril	<i>Mycoarthritis corallinus</i>	99,28	<i>Mycoarthritis corallinus</i>	1	0	1
3438	<i>Neofabraea</i> sp.	<i>Neofabraea alba</i>	99,81	<i>Neofabraea alba</i> *	1	0	1
3559	<i>Oidiodendron</i> sp.	<i>Oidiodendron</i> sp.	97,49	<i>Oidiodendron</i> sp. *	1	0	1
3385	<i>Paecilomyces carneus</i>	<i>Paecilomyces carneus</i>	100,00	<i>Paecilomyces carneus</i>	0	1	1
2197	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	99,83	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	0	1

Tabla 11. Continuación.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
2482	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citrinum</i>	99,62	<i>Penicillium citrinum</i>	1	0	1
3724	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium thomii</i>	99,64	<i>Penicillium thomii</i>	1	0	1
3411	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium virgatum</i>	99,58	<i>Penicillium virgatum</i> *	1	0	1
2225	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99,64	<i>Penicillium</i> sp. A	1	0	1
2434	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	98,20	<i>Penicillium</i> sp. B	1	0	1
3187	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99,78	<i>Penicillium</i> sp. C	1	0	1
4150	Cultivo estéril	<i>Petriella guttulata</i>	96,52	<i>Petriella guttulata</i> *	1	0	1
3204	<i>Phaeosphaeria luctuosa</i>	<i>Phaeosphaeria luctuosa</i>	100,00	<i>Phaeosphaeria luctuosa</i>	0	1	1
2140	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	94,68	<i>Phaeosphaeria</i> sp. A	1	0	1
2152	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	96,35	<i>Phaeosphaeria</i> sp. B	1	0	1
2467	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	99,72	<i>Phaeosphaeria</i> sp. C	1	0	1
3196	<i>Phialocephala</i> sp.	<i>Phialocephala scopiformis</i>	98,91	<i>Phialocephala scopiformis</i>	1	0	1
3469	<i>Phialophora alba</i>	Ascomycete de hojarasca	97,48	<i>Phialophora alba</i> ^b	0	1	1
2834	<i>Phialophora</i> sp.	<i>Phialophora</i> sp.	100,00	<i>Phialophora</i> sp. A	1	0	1
3590	<i>Phialophora</i> sp.	<i>Phialophora</i> sp.	97,71	<i>Phialophora</i> sp. B *	1	0	1
3545	<i>Phoma terrestris</i>	<i>Alternaria longissima</i>	99,59	<i>Phoma terrestris</i> ^b	0	1	1
2453	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.	99,04	<i>Phoma</i> sp.	1	0	1
3474	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis amygdali</i>	99,47	<i>Phomopsis amygdali</i> *	1	0	1
3336	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	96,97	<i>Phomopsis</i> sp. A *	1	0	1
3516	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	98,37	<i>Phomopsis</i> sp. B *	1	0	1
2414	<i>Plectosphaerella</i> sp.	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	98,87	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	1	0	1
2811	<i>Pleurophoma</i> sp.	<i>Pleurophoma cava</i>	100,00	<i>Pleurophoma cava</i>	1	0	1
3965	<i>Podospora tetraspora</i>	<i>Podospora tetraspora</i>	99,06	<i>Podospora tetraspora</i>	0	1	1
3574	<i>Preussia</i> sp.	<i>Preussia isomera</i>	100,00	<i>Preussia isomera</i> *	1	0	1
2821	<i>Preussia</i> sp.	<i>Preussia minima</i>	98,44	<i>Preussia minima</i>	1	0	1
3305	<i>Preussia</i> sp.	<i>Preussia</i> sp.	99,43	<i>Preussia</i> sp. *	1	0	1
3767	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	94,62	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	0	1	1
2051	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula glutinis</i>	99,66	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	0	1
3209	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	99,82	<i>Rhodotorula slooffiae</i> *	1	0	1
3185	Cultivo estéril	<i>Schizothecium</i> sp.	96,34	<i>Schizothecium</i> sp.	1	0	1
3941	Cultivo estéril	<i>Sordaria fimicola</i>	99,82	<i>Sordaria fimicola</i>	0	1	1

Tabla 11. Continuación.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
3734	<i>Sporormia</i> sp.	<i>Sporormia subticinensis</i>	99,81	<i>Sporormia subticinensis</i>	1	0	1
2426	<i>Tilletiopsis</i> sp.	<i>Tilletiopsis pallescens</i>	99,58	<i>Tilletiopsis pallescens</i>	1	0	1
3398	<i>Tolypocladium</i> sp.	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	100,00	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> *	1	0	1
2801	<i>Trametes</i> sp.	<i>Trametes ochracea/versicolor</i>	99,83	<i>Trametes ochracea/versicolor</i>	1	0	1
3252	<i>Trichocladium</i> sp.	<i>Trichocladium opacum</i>	99,81	<i>Trichocladium opacum</i> *	1	0	1
3570	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Verticillium nigrescens</i>	99,80	<i>Verticillium nigrescens</i> *	1	0	1
2831	<i>Volutella</i> sp.	<i>Volutella ciliata</i>	97,54	<i>Volutella ciliata</i>	1	0	1
3749	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	97,82	<i>Xylaria</i> sp.	0	1	1
2012	Xylariales sp.	Xylariales sp.	99,24	Xylariales sin identificar	1	0	1
2113	Cultivo estéril	<i>Acremonium</i> sp.	90,93	Ascomycete desconocido 5	1	0	1
2116	Cultivo estéril	Ascomycete sp.	93,02	Ascomycete desconocido 6	1	0	1
2128	Cultivo estéril	<i>Thielavia hyalocarpa</i>	92,48	Ascomycete desconocido 7	1	0	1
2190	Cultivo estéril	<i>Libertella</i> sp.	81,59	Ascomycete desconocido 8	1	0	1
2194	Cultivo estéril	<i>Microdiplodia hawaiiensis</i>	92,60	Ascomycete desconocido 9	1	0	1
2401	Cultivo estéril	Ascomycete sp.	89,25	Ascomycete desconocido 10	1	0	1
2429	Cultivo estéril	<i>Gliomastix murorum</i>	86,32	Ascomycete desconocido 11	1	0	1
2812	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	98,28	Ascomycete desconocido 12	1	0	1
2839	Cultivo estéril	Ascomycete sin identificar	100,00	Ascomycete desconocido 13	1	0	1
3208	Cultivo estéril	Ericoid mycorrhizal	93,33	Ascomycete desconocido 14 *	1	0	1
3251	Cultivo estéril	Hongo endofítico	96,92	Ascomycete desconocido 15 *	1	0	1
3259	Cultivo estéril	Hongo endofítico	94,74	Ascomycete desconocido 16 *	1	0	1
3267	Cultivo estéril	Ascomycete endofítico	82,05	Ascomycete desconocido 17 *	1	0	1
3338	Cultivo estéril	<i>Sarea</i> sp.	82,33	Ascomycete desconocido 18 *	1	0	1
3403	Cultivo estéril	<i>Lambertella pruni</i>	89,06	Ascomycete desconocido 20 *	1	0	1
3412	Cultivo estéril	Ascomycete sp.	86,82	Ascomycete desconocido 21 *	1	0	1
3538	Cultivo estéril	<i>Amphisphaeria</i> sp.	85,64	Ascomycete desconocido 22 *	1	0	1
3542	Cultivo estéril	Hongo endofítico	93,95	Ascomycete desconocido 23 *	1	0	1
3583	Cultivo estéril	<i>Madurella mycetomatis</i>	83,39	Ascomycete desconocido 24 *	1	0	1
3679	Cultivo estéril	<i>Phoma betae</i>	86,05	Ascomycete desconocido 25	1	0	1
3704	Cultivo estéril	<i>Phoma cava</i>	92,52	Ascomycete desconocido 26	1	0	1
3706	Cultivo estéril	Ascomycete sp.	97,80	Ascomycete desconocido 27	1	0	1

Tabla 11. Continuación.

AISLADO	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Raíces	Total
3809	Cultivo estéril	<i>Shiraia</i> sp.	90,60	Ascomycete desconocido 28 *	1	0	1
3210	Cultivo estéril	Ascomycete sp.	97,11	Ascomycete desconocido 36	0	1	1
3236	Cultivo estéril	Hongo endofítico	95,37	Ascomycete desconocido 37	0	1	1
3284	Cultivo estéril	<i>Phialophora</i> sp.	87,45	Ascomycete desconocido 38	0	1	1
3363	Cultivo estéril	<i>Cordyceps cylindrica</i>	94,25	Ascomycete desconocido 39	0	1	1
3423	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	93,50	Ascomycete desconocido 40	0	1	1
3434	Cultivo estéril	Helotiales sp.	93,65	Ascomycete desconocido 41	0	1	1
3461	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	91,86	Ascomycete desconocido 42	0	1	1
3487	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	93,24	Ascomycete desconocido 43	0	1	1
3541	Cultivo estéril	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	86,29	Ascomycete desconocido 44	0	1	1
3789	Cultivo estéril	Hongo endofítico	93,44	Ascomycete desconocido 45	0	1	1
3804	Cultivo estéril	Ascomycete de hojarasca	97,93	Ascomycete desconocido 46	0	1	1
3817	Cultivo estéril	Ascomycete de hojarasca	97,25	Ascomycete desconocido 47	0	1	1
3847	Cultivo estéril	<i>Podospora decidua</i>	90,80	Ascomycete desconocido 48	0	1	1
3855	Cultivo estéril	Hongo de tierra	91,13	Ascomycete desconocido 49	0	1	1
3857	Cultivo estéril	<i>Dactylaria junci</i>	86,80	Ascomycete desconocido 50	0	1	1
3874	Cultivo estéril	<i>Flumicola coronata</i>	82,03	Ascomycete desconocido 51	0	1	1
3894	Cultivo estéril	<i>Trichoderma</i> sp.	82,32	Ascomycete desconocido 52	0	1	1
3966	Cultivo estéril	<i>Preussia aemulans</i>	90,39	Ascomycete desconocido 53	0	1	1

Nota. ^a La especie fue identificada finalmente como *Alternaria* sp. debido a que la identificación molecular dio un porcentaje de identidad en FASTA del 100% para las especies *Alternaria arborescens*, *Alternaria longipes*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria mali* y *Alternaria alternata*. ^b Identificación propuesta basada en la identificación morfológica. *Especie foliar identificada en las 11 localidades donde se analizaron muestras de hojas y raíces.

Tabla 12. Distribución taxonómica de la micobiota endofítica aislada de *Holcus lanatus*.

PHYLUM/Orden/ Familia	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES	PHYLUM/Orden/ Familia	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES
ASCOMYCOTA			Incertae sedis		
Botryosphaeriales			<i>Apiosporaceae</i>	1	1
<i>Botryosphaeriaceae</i>	2	3	<i>Magnaporthaceae</i>	1	2
Capnodiales			<i>Myxotrichaceae</i>	1	1
<i>Davidiellaceae</i>	1	2	<i>Plectosphaerellaceae</i>	2	2
Coniochaetales			Incertae sedis	2	2
<i>Coniochaetaceae</i>	1	1	Sin identificar	6	53
Diaporthales			Total	76	190
<i>Diaporthaceae</i>	2	7	BASIDIOMYCOTA		
<i>Gnomoniaceae</i>	3	3	Agaricales		
<i>Valsaceae</i>	1	1	<i>Agaricaceae</i>	1	1
Dothideales			<i>Psathyrellaceae</i>	1	1
<i>Dothioraceae</i>	1	1	<i>Strophariaceae</i>	1	1
Eurotiales			Cantharellales		
<i>Trichocomaceae</i>	3	13	<i>Ceratobasidiaceae</i>	1	1
Helotiales			Leucosporidiales		
<i>Dermataceae</i>	2	2	Incertae sedis	1	1
<i>Hyaloscyphaceae</i>	2	2	Polyporales		
<i>Vibrissaceae</i>	1	1	<i>Polyporaceae</i>	1	1
Incertae sedis	3	5	Sporidiobolales		
Hypocreales			Incertae sedis	1	2
<i>Clavicipitaceae</i>	1	1	Tremellales		
<i>Cordycipitaceae</i>	1	2	<i>Tremellaceae</i>	2	6
<i>Nectriaceae</i>	2	10	Ustilaginales		
<i>Ophycordycipitaceae</i>	1	1	<i>Ustilaginaceae</i>	1	1
Incertae sedis	5	8	Incertae sedis		
Microascales			Incertae sedis	1	1
<i>Ceratocystidaceae</i>	1	1	Total	11	16
<i>Microascaceae</i>	1	1	ZYGOMYCOTA		
Phyllachorales			Mortierellales		
<i>Phyllachoraceae</i>	2	5	<i>Mortierellaceae</i>	1	1
Pleosporales			Mucorales		
<i>Leptosphaeriaceae</i>	2	4	<i>Mucoracellaceae</i>	1	1
<i>Phaeosphaeriaceae</i>	1	6	Total	2	2
<i>Pleosporaceae</i>	7	11	TOTAL	89	208
<i>Sporormiaceae</i>	2	4			
<i>Tubeufiaceae</i>	1	1			
Incertae sedis	5	8			
Sin identificar	6	1			
Rhizomatales					
<i>Rhizomataceae</i>	1	1			
Saccharomycetales					
Incertae sedis	1	1			
Sordariales					
<i>Cephalothecaceae</i>	1	1			
<i>Chaetomiaceae</i>	2	7			
<i>Lasiophaeriaceae</i>	2	2			
<i>Sordariaceae</i>	1	1			
Trichosphaeriales					
Incertae sedis	1	2			
Xylariales					
<i>Amphisphaeriaceae</i>	1	1			
<i>Diatrypaeae</i>	1	1			
<i>Xylariaceae</i>	3	3			
Incertae sedis	1	2			
Sin identificar	6	1			

4.2.3. Abundancia y diversidad biológica.

Las especies de hongos más abundantes en *Holcus*, con más de 10 aislados cada uno han sido: *Alternaria* sp. (91 aislados), *Cladosporium* sp. (67), *Penicillium* sp. (37), *Epicoccum* sp. (33), *Acremonium* sp. (22), *Podospora* sp. (15), *Curvularia inaequalis* (14), y *Arthrimum* sp. (13) (Figura 37), las cuales comprenden el 48,3% del total de aislados obtenidos. Estas 8 especies pueden considerarse la micobiota dominante de *H. lanatus*.

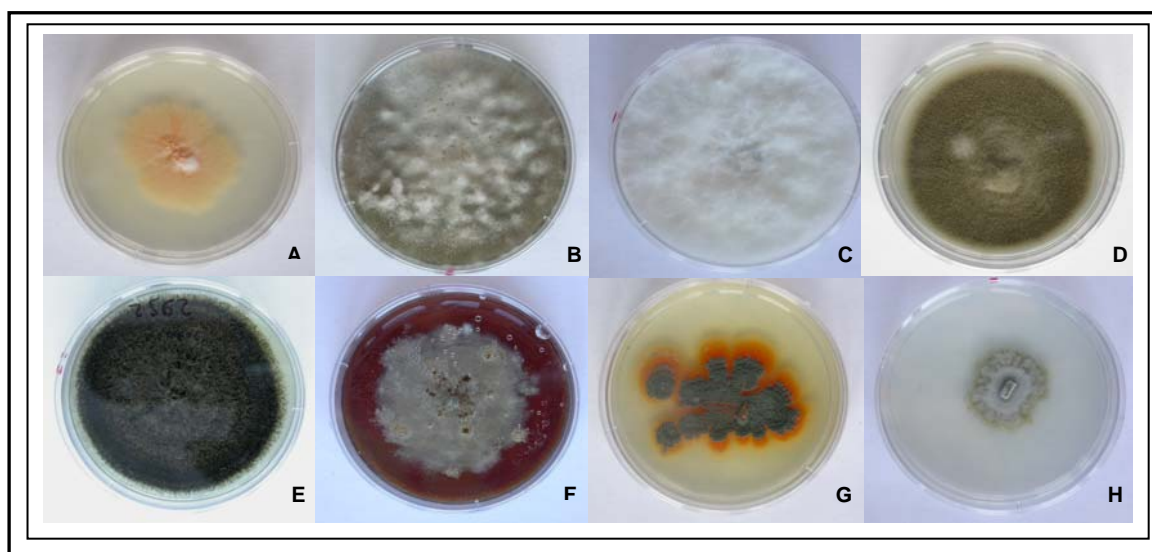


Figura 37. Cultivos en PDA de las especies de hongos más abundantes en *Holcus lanatus*. **A.** *Acremonium* sp. **B.** *Alternaria* sp. **C.** *Arthrimum* sp. **D.** *Cladosporium* sp. **E.** *Curvularia inaequalis*. **F.** *Epicoccum* sp. **G.** *Penicillium* sp. **H.** *Podospora* sp.

Cincuenta de las 157 especies foliares aisladas fueron plurales (31,9%), representadas por más de un aislado, frente a las 107 especies únicas (68,2%), representadas únicamente por un aislado. En las raíces, 24 especies fueron plurales (30,4%) y 55 únicas (69,6%). De las 208 especies diferentes identificadas en *Holcus*, 73 fueron plurales (35,1%), las cuales comprenden el 79,6% del total de aislados, y 135 especies fueron únicas (64,9%).

El índice de diversidad de Shannon tuvo un valor de 4,28 para el total de especies aisladas.

4.2.4. Comparación entre la micobiota de hojas y raíces.

La comparación entre la micobiota de la hojas y raíces de *Holcus* se hizo solamente con los datos de las 11 localidades de las que se realizaron aislamientos de ambos órganos en cada planta (Tabla 13). Veintidos especies fueron comunes a ambas partes de la planta (Tabla 14).

El índice de diversidad de Shannon tuvo un valor de 4,02 para las especies foliares y de 4,13 para las aisladas de raíz. Este valor es más elevado que el obtenido en otras comunidades de endofitos (Arnold *et al.*, 2000, 2007; Gamboa y Bayman, 2001; Kumar y Hyde, 2004; Raviraja, 2005; Higgins *et al.*, 2006; White y Backhouse, 2007), al igual que sucedía en *Dactylis glomerata*.

Tabla 13. Número de aislados y especies de hongos endofíticos identificadas en hojas y raíces de *Holcus lanatus* de las 11 localidades donde se realizaron aislamientos de los 2 órganos de la planta. El índice de diversidad de Shannon (H') fue calculado para el total de aislados y especies de endofitos observadas en cada localidad y órgano.

LOCALIDADES	N° AISLADOS		N° ESPECIES		DIVERSIDAD (H')	
	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces	Hojas	Raíces
Aldeanueva del Camino	22	10	16	8	2,5	2,25
Casas del Monte, zona A	9	5	7	5	3,03	2,97
Casas del Monte, zona B	20	20	16	19	3,35	3,3
Garganta del Infierno	19	4	12	4	3,49	3,51
Jerte	18	11	14	9	3,61	3,69
Jerte, río Jerte	16	14	14	12	3,71	3,8
Las Caldas	32	25	21	19	3,8	3,9
Moreruela de los Infanzones	18	22	10	19	3,86	3,99
Plasencia, río Jerte	14	7	9	7	3,92	4,05
Puerto de Honduras	9	7	8	5	3,97	4,11
Torres del Carrizal	22	24	9	21	4,02	4,16
TOTAL	199	149	77*	79*	4,02	4,13
MEDIA por localidad	18,09	13,45	7	7,18	3,57	3,61
MEDIA por planta	2,58	1,94	1	1,03	-	-

Nota. * Los totales no se corresponden con la suma de las filas anteriores debido a que hay especies comunes a varias localidades.

Tabla 14. Diecinueve especies de endofitos aisladas e identificadas tanto en hojas como en raíces de *Holcus lanatus* en las 11 localidades de las que se realizaron aislamientos de ambas partes de la planta.

ESPECIE	N° DE AISLADOS		
	Hojas	Raíces	Total
<i>Alternaria</i> sp.	26	9	35
<i>Cladosporium</i> sp.	27	3	30
<i>Penicillium</i> sp.	13	8	21
<i>Epicoccum</i> sp.	11	5	16
<i>Curvularia inaequalis</i>	9	5	14
<i>Acremonium</i> sp.	3	9	12
<i>Podospora</i> sp.	3	7	10
<i>Aspergillus tubingensis</i>	6	3	9
<i>Arthrinium</i> sp.	7	1	8
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	4	5
<i>Drechslera</i> sp. B		4	4
<i>Microdochium</i> sp.	1	3	4
<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	3	1	4
<i>Fusarium equiseti</i>	1	2	3
<i>Epichloë clarkii</i>	1	1	2
<i>Nigrospora</i> sp.	1	1	2
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	1	1	2
<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	1	1	2
<i>Phoma herbarum</i>	1	1	2
Ascomycete desconocido 19	1	1	2
Ascomycete desconocido 29	1	1	2
Ascomycete desconocido 30	1	1	2
TOTAL	120	72	192

Al realizarse una comparación cuantitativa de la riqueza de aislados y de especies endofíticas de cada parte de la planta, se observó que la diferencia entre las medias del número de aislados obtenidos de hojas y raíces en cada localidad no fue estadísticamente significativa ($t = -1,4799$; $p > 0,05$). En cuanto al número de especies, la diferencia entre las medias de hojas y raíces tampoco resultó significativa ($t = -0,3061$; $p > 0,05$), al igual que la diferencia entre la diversidad observada (H') en cada órgano ($t = -0,1908$; $p > 0,05$). Por lo tanto, numéricamente, las diferencias en número de aislados, especies y H' no son significativas entre hojas y raíces.

Cuando se elaboraron las curvas de acumulación de especies para los aislados de hojas y raíces de las 11 localidades (Figura 38), se observó que para el total de especies analizadas, ambas curvas fueron no asintóticas (Figura 38, curvas continuas), lo que indica que la diversidad endofítica se incrementaría si aumentara el número de plantas analizadas. Sin embargo, las curvas para las especies plurales resultaron ser asintóticas (Figura 38,

curvas discontinúas), lo que indica que la mayoría de especies comúnmente asociadas a *Holcus lanatus* han sido aisladas e identificadas en el estudio.

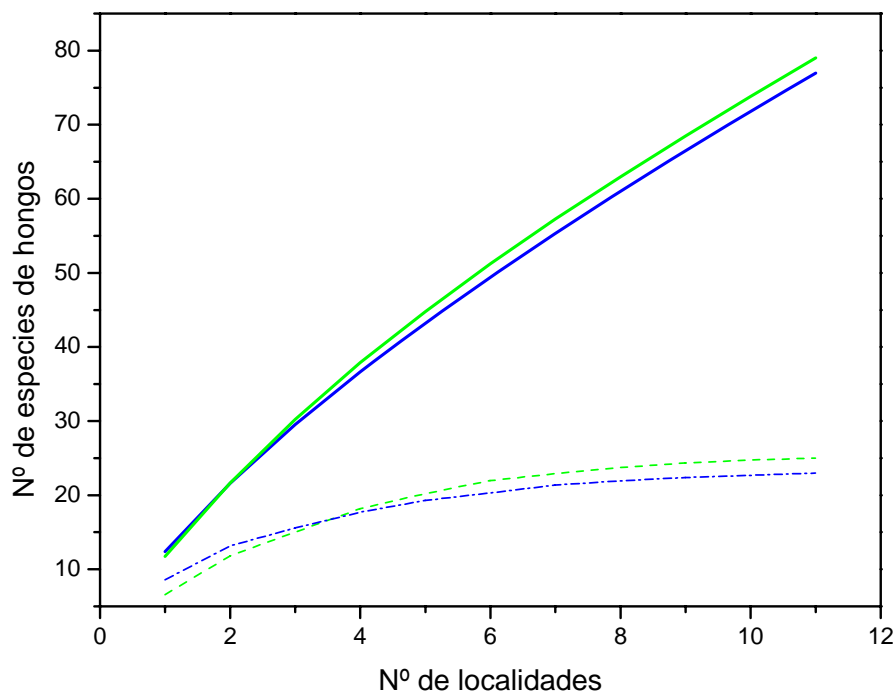


Figura 38. Curvas de acumulación de especies de hojas (verdes) y raíces (azules) de plantas de *Holcus lanatus* de 11 localidades en las que se aislaron endofitos de hojas y raíces, para el total de especies de endofitos aisladas (curvas continuas), y para las especies plures (curvas discontinuas), ambas mostrando la relación entre el nº de localidades analizadas y el nº total de especies de hongos aislados e identificados.

Además, para el estudio de la riqueza endofítica de *Holcus* en las 11 localidades en que se aislaron hongos de parte aérea y subterránea se calcularon una serie de estimadores de la riqueza total de especies (Tabla 15). El estimador ICE produjo los datos más altos de estimación de las especies foliares, y Chao 2 proporcionó los mayores valores de estimación de las especies de raíces. El estimador Bootstrap produjo los valores menores de riqueza de especies en hojas y raíces. Sin embargo, las curvas producidas por todos estos estimadores fueron no asintóticas, lo cual dificulta el derivar conclusiones de los resultados aportados por cualquiera de estos estimadores.

Tabla 15. Valores de los estimadores del número total de especies de endofitos asociadas a *Holcus lanatus*, para las especies identificadas en hojas y raíces de las 11 localidades de las que se aislaron endofitos de ambos órganos de la planta.

ESTIMADORES	Hojas	Raíces
ICE	277,07	228,61
Chao 2	238,21	240,21
Jackknife 1	128,82	130,82
Jackknife 2	169,56	171,56
Bootstrap	97,97	100,06
Michaelis-Menten	184,76	308,47

Como cabía esperar tras los resultados proporcionados por las curvas de acumulación de especies, se detectó una correlación estadísticamente significativa entre el número de aislados obtenidos y el de especies identificadas, tanto en hojas (Figura 39A), como en raíces (Figura 39B).

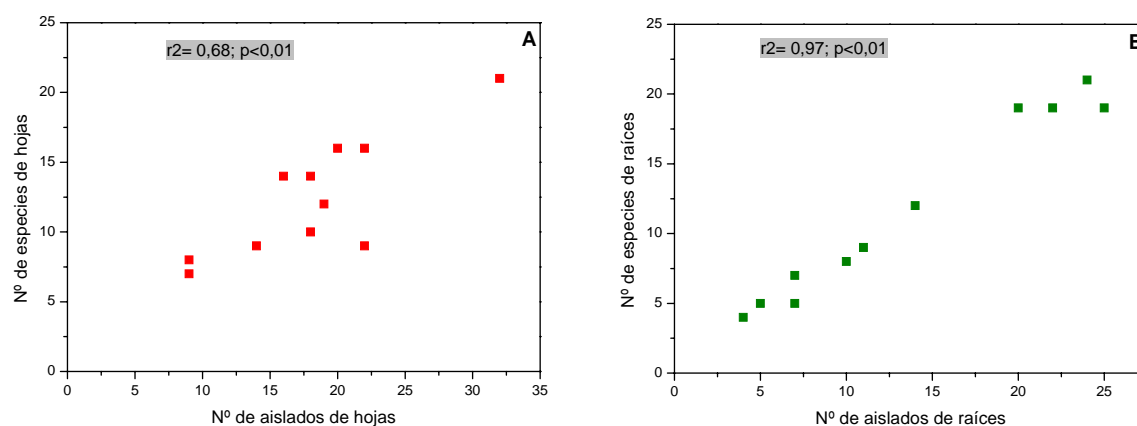


Figura 39. Análisis de correlaciones entre el nº de aislados obtenidos y el de especies identificadas en hojas (A) y raíces (B), de *Holcus lanatus* en las 11 localidades en que se han aislado endofitos de ambos órganos.

Para analizar las diferencias cualitativas de la micobiota endofítica de hojas y raíces se analizó la similitud (Jaccard) en la micobiota de cada par de localidades (Tabla 16). El valor promedio de la similitud entre las micobiotas de hojas fue de $J = 0,149$ y el de las de raíces de $J = 0,081$. La diferencia entre estos valores de similitud en cada órgano fue estadísticamente significativa ($t = -5,2648$; $p < 0,05$). Al comparar la micobiota de hojas y raíces de cada localidad (Tabla 17), la media de las 11 localidades fue de $J = 0,088$, lo que

indica que por estar en la misma localidad, los endofitos que hay en hojas no son más parecidos a los que hay en raíces, o a los de hojas de otras localidades.

Tabla 16. Similitud estimada mediante el índice de Jaccard, en la composición de la micobiota de hojas (negro) o raíces (azul) entre las 11 localidades.

	A	CMa	CMb	GI	J	JrJ	LC	MI	P	PH	TC
A		0,15 (3) ^a	0,143 (4)	0,13 (3)	0,143 (4)	0,2 (5)	0,121 (4)	0,13 (3)	0,19 (4)	0,043 (1)	0,087 (2)
CMa	0,083 (1) ^a		0,095 (2)	0,133 (2)	0,211 (4)	0,235 (4)	0,077 (2)	0,214 (3)	0,231 (3)	0,071 (1)	0,067 (1)
CMb	0,083 (2)	0,045 (1)		0,13 (3)	0,143 (4)	0,304 (7)	0,156 (5)	0,13 (3)	0,136 (3)	0,043 (1)	0,136 (3)
GI	0,091 (1)	0,125 (1)	0,048 (1)		0,13 (3)	0,143 (3)	0,107 (3)	0,111 (2)	0,188 (3)	0,059 (1)	0,118 (2)
J	0,063 (1)	0,077 (1)	0,08 (2)	0 (0)		0,25 (6)	0,088 (3)	0,13 (3)	0,19 (4)	0,043 (1)	0,042 (1)
JrJ	0,111 (2)	0 (0)	0,111 (3)	0 (0)	0,105 (2)		0,167 (5)	0,2 (4)	0,211 (4)	0,048 (1)	0,15 (3)
LC	0,174 (4)	0,043 (1)	0,156 (5)	0,045 (1)	0,12 (3)	0,107 (3)		0,192 (5)	0,111 (3)	0,074 (2)	0,364 (8)
MI	0,074 (2)	0,083 (2)	0,083 (3)	0,042 (1)	0,111 (3)	0,1 (3)	0,143 (5)		0,357 (5)	0,125 (2)	0,357 (5)
P	0,25 (3)	0,091 (1)	0,042 (1)	0 (0)	0,143 (2)	0,056 (1)	0,083 (2)	0,077 (2)		0,063 (1)	0,2 (3)
PH	0,182 (2)	0 (0)	0,095 (2)	0,125 (1)	0 (0)	0,063 (1)	0,043 (1)	0,04 (1)	0,091 (1)		0,133 (2)
TC	0,115 (3)	0 (0)	0,026 (1)	0 (0)	0,111 (3)	0,1 (3)	0,212 (7)	0,167 (2)	0,037 (1)	0 (0)	

Nota. ^a Número de especies en común entre ambas localidades. Localidades: Aldeanueva del Camino (A), Casas del Monte, Zona A (CMa), Casas del Monte, zona B (CMb), Garganta del Infierno (GI), Jerte (J), Jerte, río Jerte (JrJ), Las Caldas (LC), Moreruela de los Infanzones (MI), Plasencia (P), Puerto de Honduras (PH), Torres del Carrizal (TC).

Tabla 17. Similitud estimada mediante el índice de Jaccard entre la micobiota de hojas y raíces en cada una de las 11 localidades.

ÓRGANO	A	CMa	CMb	GI	J	JrJ	LC	MI	P	PH	TC	TOTAL
Hojas/ raíces	0,143	0,091	0,133	0	0,087	0,13	0,143	0,143	0	0,067	0,033	0,088

Nota. Localidades: Aldeanueva del Camino (A), Casas del Monte, Zona A (CMa), Casas del Monte, zona B (CMb), Garganta del Infierno (GI), Jerte (J), Jerte, río Jerte (JrJ), Las Caldas (LC), Moreruela de los Infanzones (MI), Plasencia (P), Puerto de Honduras (PH), Torres del Carrizal (TC).

La correlación entre el número de aislados observados en raíces y el número observado en hojas fue débil (Figura 40A) y aun más débil fue la correlación entre el número de especies observadas en hojas y el número de especies en raíces (Figura 40B). Estos resultados indican la existencia de cierta independencia entre la micobiota de hojas y la de raíces, y que la abundancia en una parte no influye en la otra, como hubiese sido posible esperar.

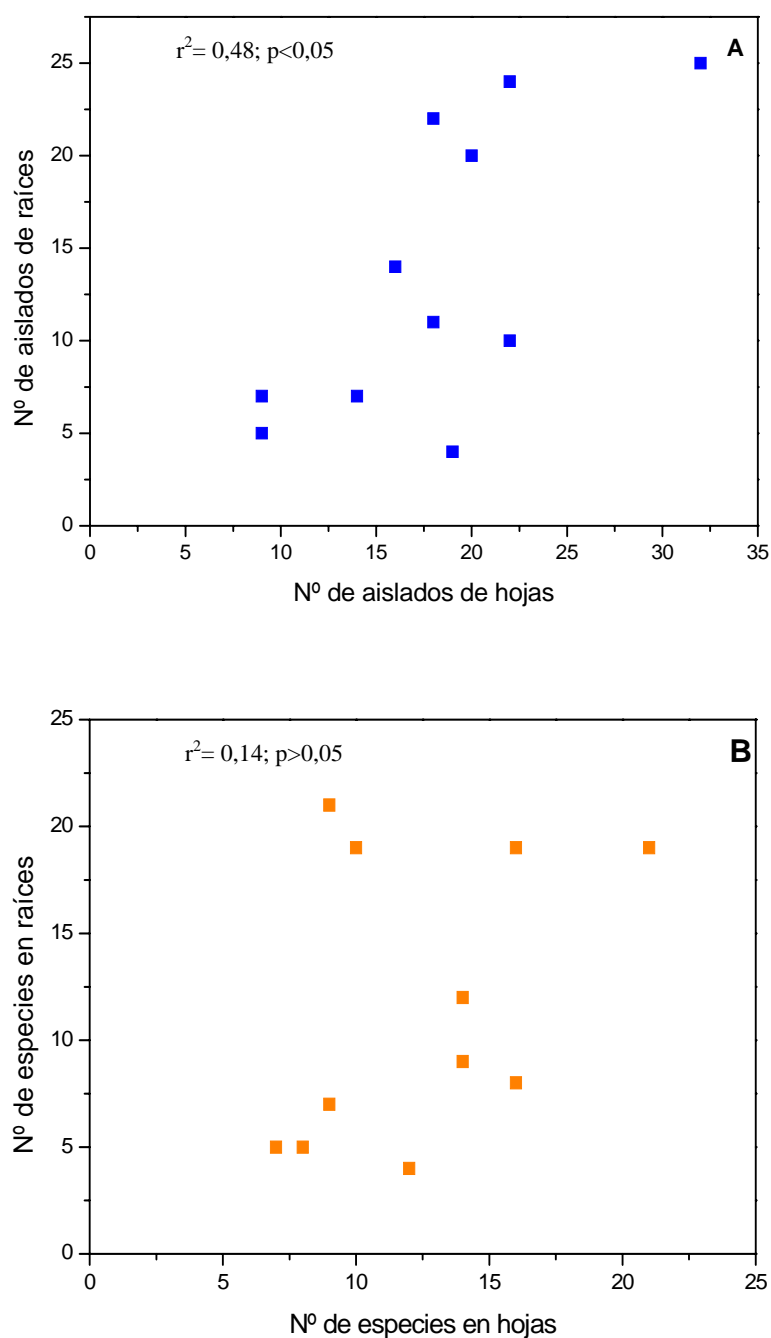


Figura 40. Correlación entre el nº de aislados de hojas y de raíces (A), y entre el nº de especies de hojas y raíces (B) de *Holcus lanatus*, en las 11 localidades en que se han aislado endofitos de ambas partes de la planta.

El 13,9% de las especies aisladas de las 11 localidades han sido comunes a hojas y raíces de *H. lanatus*. El resto han sido aisladas exclusivamente de un órgano de la planta, por lo que podrían ser endofitos específicos de ese órgano, aunque no es posible saber esto

con certeza, ya que son especies que fueron representadas por un número bajo de aislados. Algunos taxones como por ejemplo *Aureobasidium pullulans*, con 9 aislados en hojas y ninguno en raíces, y *Chaetomium globosum* y *Drechslera* sp., con 5 aislados en hojas y ninguno en raíces podrían ser específicos de hojas. Otros taxones como *Drechslera* sp. B, *Leptodontidium* sp. o *Periconia macrospinososa*, con 4 aislados de raíces cada uno y ninguno en hojas, podrían ser específicos de raíces (Figura 41).

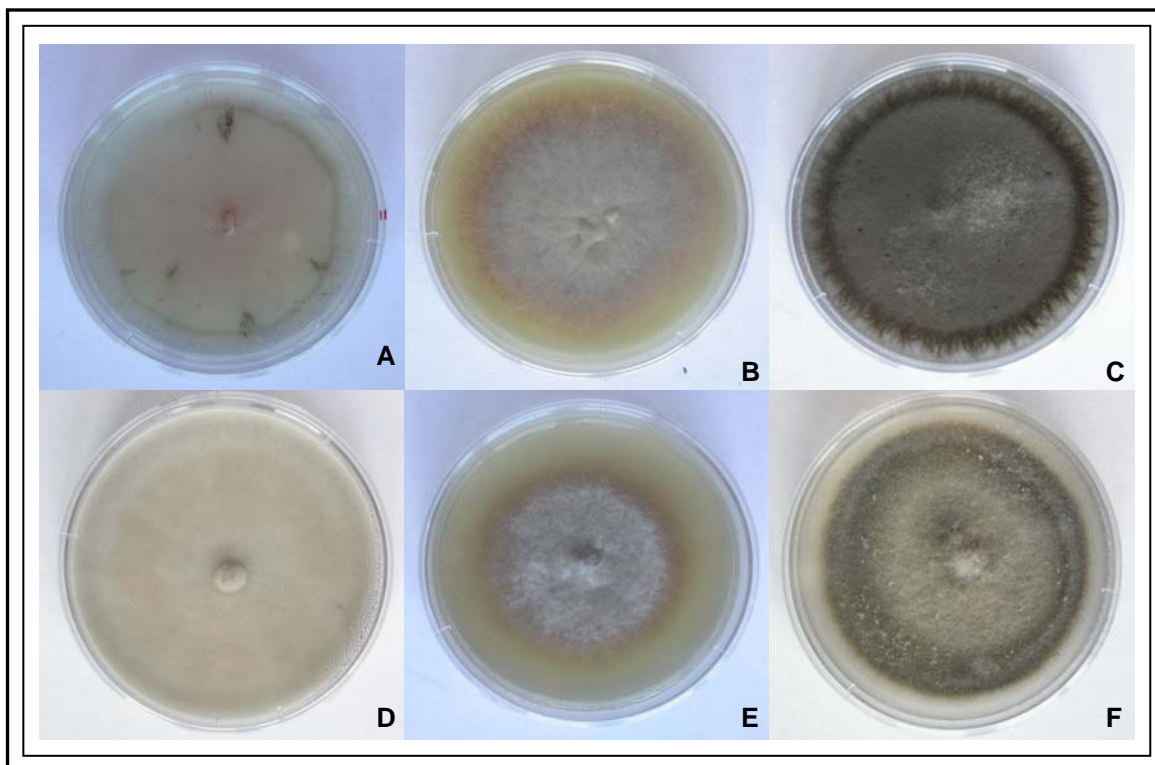


Figura 41. Cultivos en PDA de las especies aisladas de *Holcus lanatus* que podrían ser específicas de hojas (A, B y C), o de raíces (D, E y F). **A.** *Aureobasidium pullulans*. **B.** *Chaetomium globosum*. **C.** *Drechslera* sp. **D.** *Drechslera* sp. B. **E.** *Leptodontidium* sp. **F.** *Periconia macrospinososa*

4.2.5. Efectos geográficos en la composición de especies.

Las especies más cosmopolitas, aisladas de más de 10 localidades, fueron *Cladosporium* sp. (25 localidades), *Alternaria* sp. (24), *Aureobasidium pullulans* (17), *Penicillium* sp. (16) y *Epicoccum* sp. (15), *Acremonium* sp. (14), y *Podospora* sp. (12) (Figura 42). Otros taxones encontrados en 5 o más localidades fueron: *Aspergillus tubingensis* (9), *Curvularia inaequalis* (9), *Drechslera* sp. A (7), *Arthrrium* sp. (6), *Chaetomium globosum* (6), *Chaetomium* sp. (6), *Drechslera* sp. (6), *Fusarium oxysporum*

(5) y *Phialemonium dimorphosporum* (5). El 72% de las especies fueron aisladas en una sola localidad.

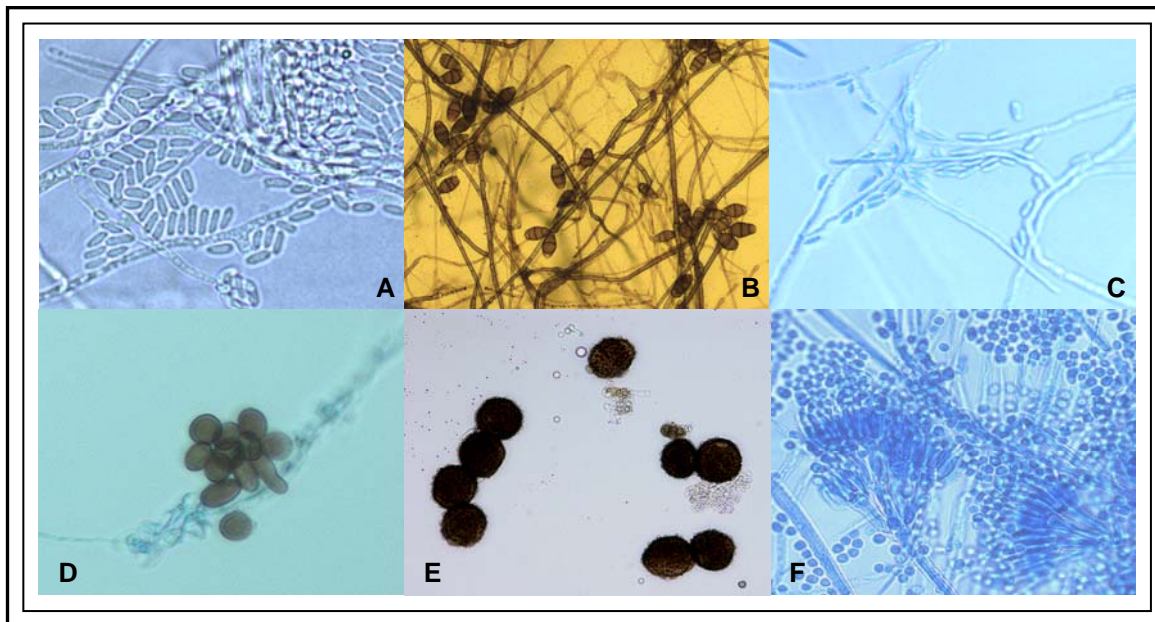


Figura 42. Fotografías a microscopía óptica de algunas de las especies aisladas de *Holcus lanatus* en más de 10 localidades. **A.** *Acremonium* sp. **B.** *Alternaria* sp. **C.** *Aureobasidium pullulans*. **D.** *Cladosporium* sp. **E.** *Epicoccum* sp. **F.** *Penicillium* sp.

Para comprobar si la similitud entre pares de localidades disminuye al aumentar la distancia, se calculó el coeficiente de Jaccard para las especies de hojas aisladas en más de una localidad, y la relación entre la similitud y la distancia fue analizada mediante correlación. La representación gráfica de ambas variables mostró 4 zonas claramente diferenciadas según la distancia entre localidades (Figura 43). La regresión no detectó una asociación estadísticamente significativa entre la distancia entre localidades y la similitud de sus micobiotas ($r^2 = 0,0068$, $p > 0,05$).

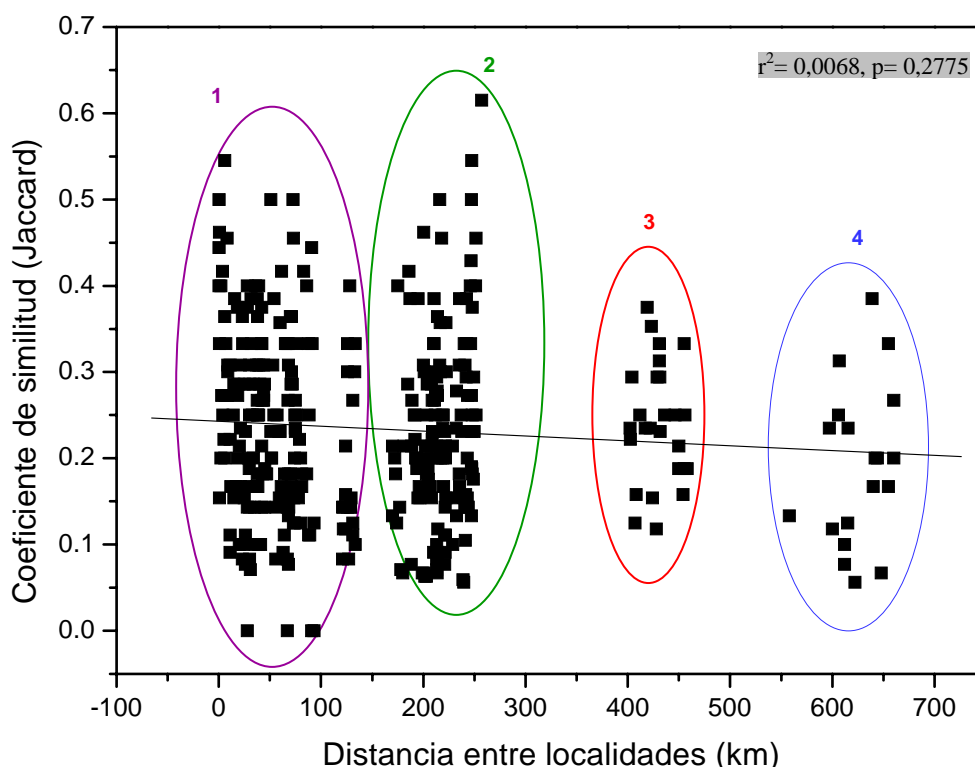


Figura 43. Relación entre la semejanza entre parejas de localidades y su distancia en el conjunto de especies de hojas de *Holcus lanatus*. El conjunto de endofitos fue comparado para 28 localidades. Sólo las especies presentes en más de una localidad fueron consideradas. El coeficiente de Jaccard fue usado para estimar la similitud del conjunto de endofitos de todos los pares de localidades, y la relación entre la similitud y la distancia fue analizada mediante regresión lineal. La **zona 1** abarca las localidades de Cáceres y Salamanca, la **zona 2** abarca las localidades de Cáceres y Zamora, la **zona 3** abarca la localidad de Las Caldas con las localidades de Cáceres y Salamanca, y Cordobelas con las localidades de Zamora, y la **zona 4** abarca la localidad de Cordobelas con las localidades de Cáceres y Salamanca.

4.2.6. Discusión.

En la actualidad no existe ningún trabajo publicado sobre hongos endofíticos de *Holcus lanatus*. Sí existen estudios sobre micorrizas, en los cuales se ha observado que los hongos micorrícicos arbusculares (AMF) confieren resistencia al arsénico a plantas de esta especie (González-Chávez *et al.*, 2002), y que la infección por micorrizas confiere una mejora en la producción de biomasa en monocultivos de esta planta (West, 1996).

En el presente estudio se observó que *Holcus lanatus* posee una gran diversidad endofítica. Ciento cincuenta y siete especies fueron aisladas de hojas de 196 muestras y 79 especies de raíces de 77 muestras (Tabla 11), siendo 208 el total de especies diferentes

identificadas en *Holcus*. Estos valores podrían ser mayores, debido a que existen hongos, como los biotrofos obligados, que no pueden ser aislados con los métodos utilizados.

El grupo de Ascomycetes fue el mayoritario, con la presencia de géneros como *Alternaria*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, y *Phomopsis*, también aislados en plantas de otras familias (Bills, 1996; Stone *et al.*, 2004; Schulz y Boyle, 2005). El predominio de este grupo ha sido observado ya en *Dactylis glomerata* (Sánchez-Márquez *et al.*, 2007) y en estudios anteriores sobre endofitos de otras gramíneas (Barata, 2002; Wiersel *et al.*, 2001; Wong y Hyde, 2001; Morakotkarn *et al.*, 2006).

Varios géneros de potenciales patógenos de cultivos de cereales, como el trigo o la cebada, fueron aislados de plantas asintomáticas de *Holcus lanatus*. En estos cereales, géneros como *Alternaria*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helgardia*, *Leptosphaeria*, *Microdochium*, *Phoma*, y *Ulocladium*, están asociados a varias enfermedades (Mathre, 1982; Wiese, 1987, Farr *et al.*, 1989). De estos géneros, *Alternaria*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Epicoccum*, y *Fusarium*, fueron frecuentemente aislados como endofitos de *Holcus* (Figura 44). Estos resultados implican que *Holcus lanatus*, al igual que *Dactylis glomerata*, podría actuar como hospedador alternativo y reservorio de patógenos de cereales.

Al comparar las micobiotas de hojas con las de raíces, no se observaron diferencias cuantitativas entre ambas. Las diferencias entre número de aislados observados, especies identificadas, o índices de diversidad no fueron estadísticamente significativas (Tabla 13). Los valores del índice de diversidad de Shannon (H') fueron relativamente altos en comparación con los observados en otras comunidades de endofitos (Arnold *et al.*, 2000, 2007; Gamboa y Bayman, 2001; Kumar y Hyde, 2004; Raviraja, 2005; Higgins *et al.*, 2006; White y Backhouse, 2007), al igual que sucedía en *Dactylis glomerata*.

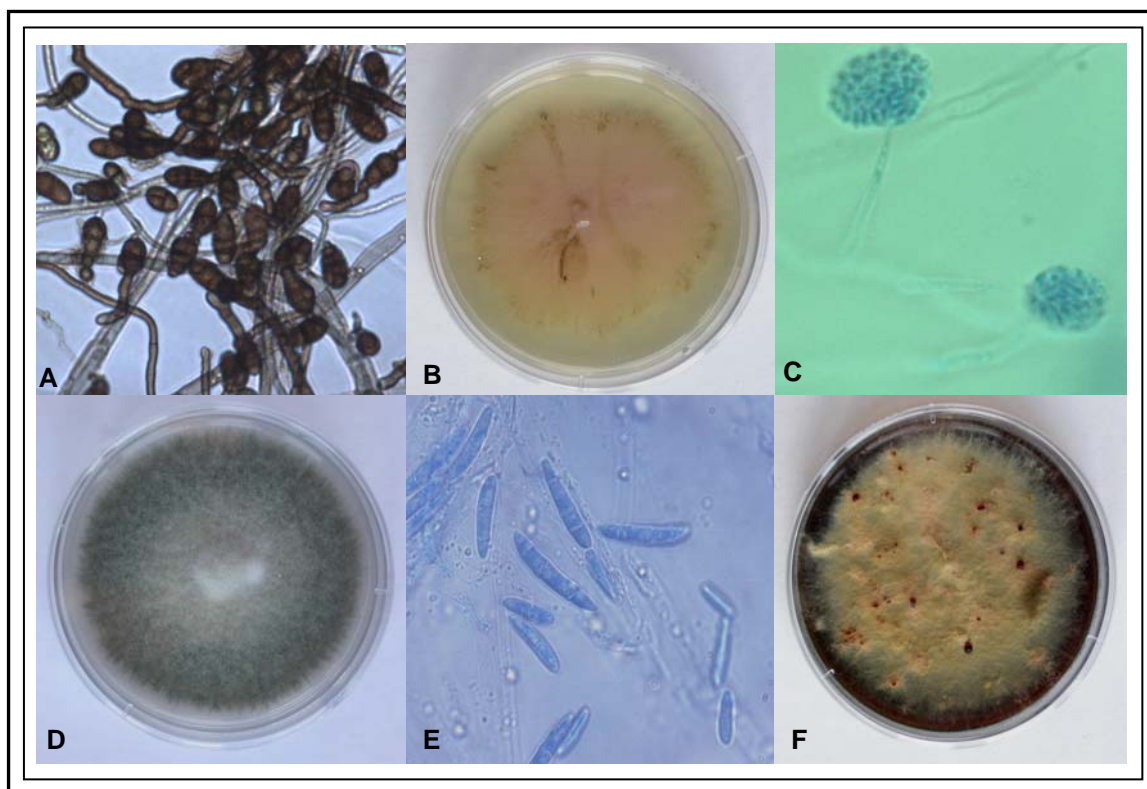


Figura 44. Fotografías a microscopía óptica y de cultivos en PDA y de algunos de los géneros aislados con frecuencia de *Holcus lanatus*, y que son patógenos de cultivos de cereales. **A.** *Alternaria*. **B.** *Aureobasidium*. **C.** *Acremonium*. **D.** *Drechslera*. **E.** *Fusarium*. **F.** *Epicoccum*.

Tanto las curvas no asintóticas de acumulación de especies (Figura 38) como las correlaciones significativas entre el número de aislados obtenidos y el número de especies identificadas (Figura 39) indican que si aumentara el número de plantas o localidades analizadas, nuevas especies serían identificadas, siendo con probabilidad estos nuevos hongos aislados especies únicas.

Los valores de los estimadores Bootstrap, ICE y Chao 2 (Tabla 14) nos indican que según la estimación del número total de especies, al menos entre 98 y 277 especies podrían llegarse a encontrar en hojas de *Holcus*, y entre 100 y 240 especies en raíces. Sin embargo, al no alcanzar crecimiento asintótico ninguna de las curvas producidas por estos estimadores, no es posible hacer un juicio sobre cual podría ser más fiable.

Al comparar cualitativamente la micobiota de hojas y raíces de *Holcus* en las 11 localidades en las que se aislaron endofitos de ambas partes, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($t = -5,2648$; $p < 0,05$) entre la similitud de especies de hojas y

la de raíces. Este resultado sugiere que la composición de la micobiota de hojas es más similar entre si en distintas localidades ($J= 0,149$) que la de raíces, cuya similaridad media entre localidades es significativamente menor ($J= 0,081$). Es posible que esta mayor similitud entre la micobiota aérea en distintas localidades se deba a que el inóculo endofítico, tal vez producido en hojas senescentes o muertas, pueda dispersarse por el aire, teniendo un mayor acceso a otras localidades que el inóculo producido por las raíces. Además, con respecto a las especies capaces de infectar hojas y raíces, el inóculo dispersado por el aire debería tener un acceso más rápido a las hojas que a las raíces.

La similitud entre las micobiotas de hojas y las de raíces de la misma localidad ($J= 0,088$) tuvo un valor menor que el de la similitud entre micobiotas de hojas en distintas localidades ($J= 0,149$), lo cual implica que por el hecho de encontrarse en la misma localidad, los endofitos de hojas no tienen que ser más parecidos a los endofitos de raíces de esa misma localidad y que independientemente de la distancia entre localidades, existen diferencias cualitativas en las micobiotas de hojas y raíces. El hecho de que no existan correlaciones fuertes entre el número de aislados o de especies hallados en hojas y en raíces (Figura 40) también apoya lo anterior e indica que la micobiota endofítica es, hasta cierto punto, distinta en hojas y raíces.

En las 11 localidades comparadas, el 16,4% de las especies fueron comunes a hojas y raíces de *H. lanatus*. Ocho de las especies de endofitos dominantes de *Holcus lanatus* (taxones con más de 10 aislados) pertenecen a este conjunto de especies comunes a ambos órganos de la planta (Tablas 11 y 14). El 86,1% de las especies restantes fueron aisladas exclusivamente de un órgano de la planta, pudiendo considerarse a algunos taxones como específicos de hojas (*Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum* y *Drechslera* sp.) y a otros como específicos de raíz (*Drechslera* sp. B, *Leptodontidium* sp. o *Periconia macrospinoso*).

El 72% del total de especies identificadas en *Holcus* fueron aisladas únicamente en una localidad. No se observó correlación entre la similitud entre pares de localidades y la distancia geográfica en las especies aisladas de hojas de las 28 localidades analizadas (Figura 43), por lo que la variación entre hojas y raíces no está asociada a la distancia entre localidades.

4.3. MICOBIOTA ENDOFÍTICA DE *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*.

4.3.1. Aislamiento de endofitos.

De un total de 168 plantas, 84 de cada especie, recogidas de 12 localidades de la provincia de La Coruña, fueron obtenidos 950 aislados de hongos endofíticos. Después de agrupar a los aislados bajo el mismo morfotipo, se descartaron muchos de ellos por ser iguales a otros obtenidos de la misma planta, llegándose a seleccionar e identificar 483 cultivos (Tabla 18). De 7 plantas de *Ammophila* y 2 de *Elymus* no se aisló ningún endofito, por lo que el 91,7% de las plantas de *Ammophila* y el 97,6% de las de *Elymus* presentaron infección endofítica por hongos.

Debido a que no fue posible aislar endofitos de rizomas de todas las plantas recogidas, los resultados que mostraremos se referirán a los endofitos aislados de hojas de 7 plantas y de rizomas de 4 plantas de cada localidad, por ser 4 el número máximo de plantas de cada localidad en las que pudieron realizarse aislamientos de rizomas.

Tabla 18. Localidades de la provincia de La Coruña donde se recogieron plantas de *Ammophila arenaria* (Aa) y *Elymus farctus* (Ef), indicando en cada localidad el número de plantas muestreadas, y el nº de aislados obtenidos y de especies identificadas en cada hospedador.

LOCALIDADES	Nº PLANTAS		Nº AISLADOS		Nº ESPECIES	
	Aa	Ef	Aa	Ef	Aa	Ef
Doniños, zona A	7	7	3	5	13	5
Doniños, zona B	7	7	21	11	10	5
Espasante	7	7	20	8	8	5
Esteiro, zona este	7	7	8	23	8	12
Esteiro, zona oeste	7	7	21	22	12	9
Lago, zona este	7	7	14	10	9	9
Lago, zona oeste	7	7	32	36	14	16
Morouzos	7	7	33	25	17	11
Pantín	7	7	18	10	11	5
Villarrube	7	7	20	23	14	14
Villarrube, zona este	7	7	34	12	18	7
Villarrube, zona oeste	7	7	16	28	15	13
TOTAL	84	84	270	213	75*	54*
MEDIA por localidad	-	-	22,5	17,75	6,25	4,5
MEDIA por planta	-	-	3,21	2,54	0,89	0,64

Nota. *Los totales no se corresponden con la suma de las filas anteriores debido a que hay especies comunes a varias localidades.

4.3.2. Identificación de los aislados.

Mediante la extracción de DNA y la amplificación y posterior secuenciación de la región nucleotídica ITS1-5.8S rRNA-ITS2, se obtuvieron las secuencias completas de 245 aislados, 149 de *Ammophila* y 96 de *Elymus*. Las secuencias de los taxones que tras el alineamiento diferían en menos del 3% de los nucleótidos fueron consideradas como pertenecientes a la misma especie, quedando tras este análisis, 66 especies distintas en *Ammophila* (Figura 45), y 46 en *Elymus* (Figura 46). Además, diez especies fueron identificadas sólo mediante caracteres morfológicos (Tablas 19, 20 y 21; n.s.), 9 aisladas de *Ammophila* y 8 de *Elymus* (7 fueron comunes a las 2 gramíneas; tabla 21, n.s.), por lo que en total se identificaron 75 especies en *Ammophila* (Tablas 19 y 21) y 54 en *Elymus* (Tablas 20 y 21). Cuarenta y nueve de las especies fueron exclusivamente aisladas de plantas de *Ammophila* (Tabla 19), 28 sólo de *Elymus* (Tabla 20), y 26 especies fueron comunes a ambos hospedadores (Tabla 21). El total de especies distintas aisladas entre ambos hospedadores ha sido de 103.

Doce especies aisladas de *Ammophila* y 4 de *Elymus* (una de ellas fue común para ambos hospedadores) no pudieron ser identificadas a nivel de especie, género o familia, por ser los cultivos estériles y no corresponder su secuencia a ningún género descrito en la base de datos, o por poseer una homología baja (<95%) con los resultados obtenidos de la base de datos EMBL/Genbank. Sin embargo, gracias a los alineamientos de secuencias fue posible clasificar una de estas especies en la división Basidiomycota y el resto en la división Ascomycota. Treinta y seis especies (35% del total) resultaron ser estériles, por lo que su identificación se basó únicamente en caracteres moleculares; las 61 especies restantes fueron identificadas por medio de caracteres morfológicos y moleculares (Tablas 19, 20 y 21), coincidiendo en todos los casos la información taxonómica aportada por la identificación morfológica y molecular.

Respecto a la distribución taxonómica de la micobiota de cada gramínea, las 75 especies de *Ammophila* pertenecen a 46 géneros, incluidos en 24 familias y 15 órdenes, mientras que las 54 especies de *Elymus* pertenecen a 36 géneros, incluidos en 22 familias y 11 órdenes (Tabla 22). Fue común a ambas gramíneas un conjunto de 26 especies (Tabla 21) pertenecientes a 11 familias y 9 órdenes.

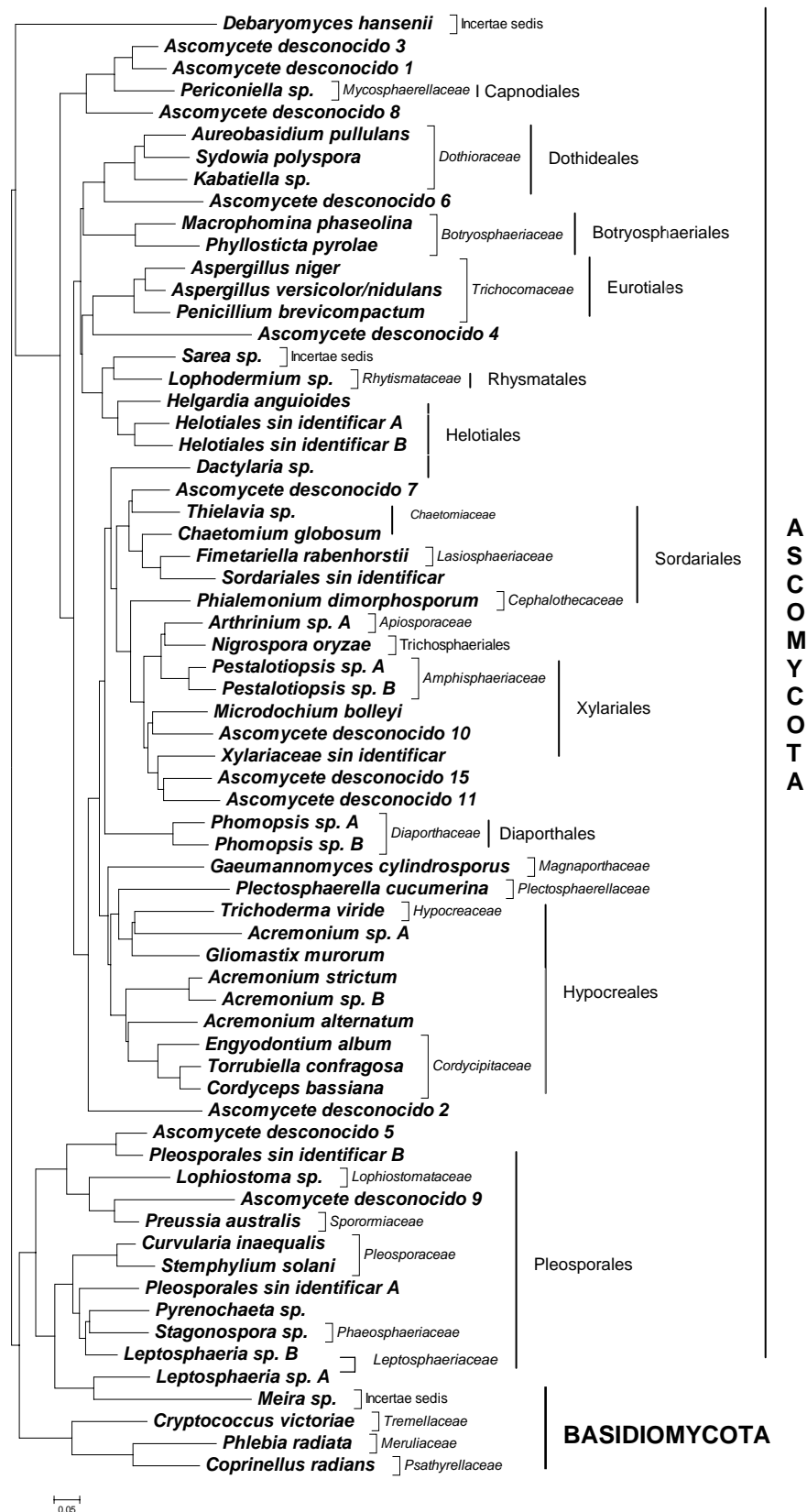


Figura 45. Dendrograma elaborado con las especies aisladas de *Ammophila arenaria*, basado en la secuencia de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2 y realizado por el método Neighbour-Joining con la distancia calculada según el método Kimura 2- parámetros. Los corchetes indican familias y las líneas verticales órdenes y phylum. La barra de escala (0,05) significa 5 sustituciones cada 100 nucleótidos.

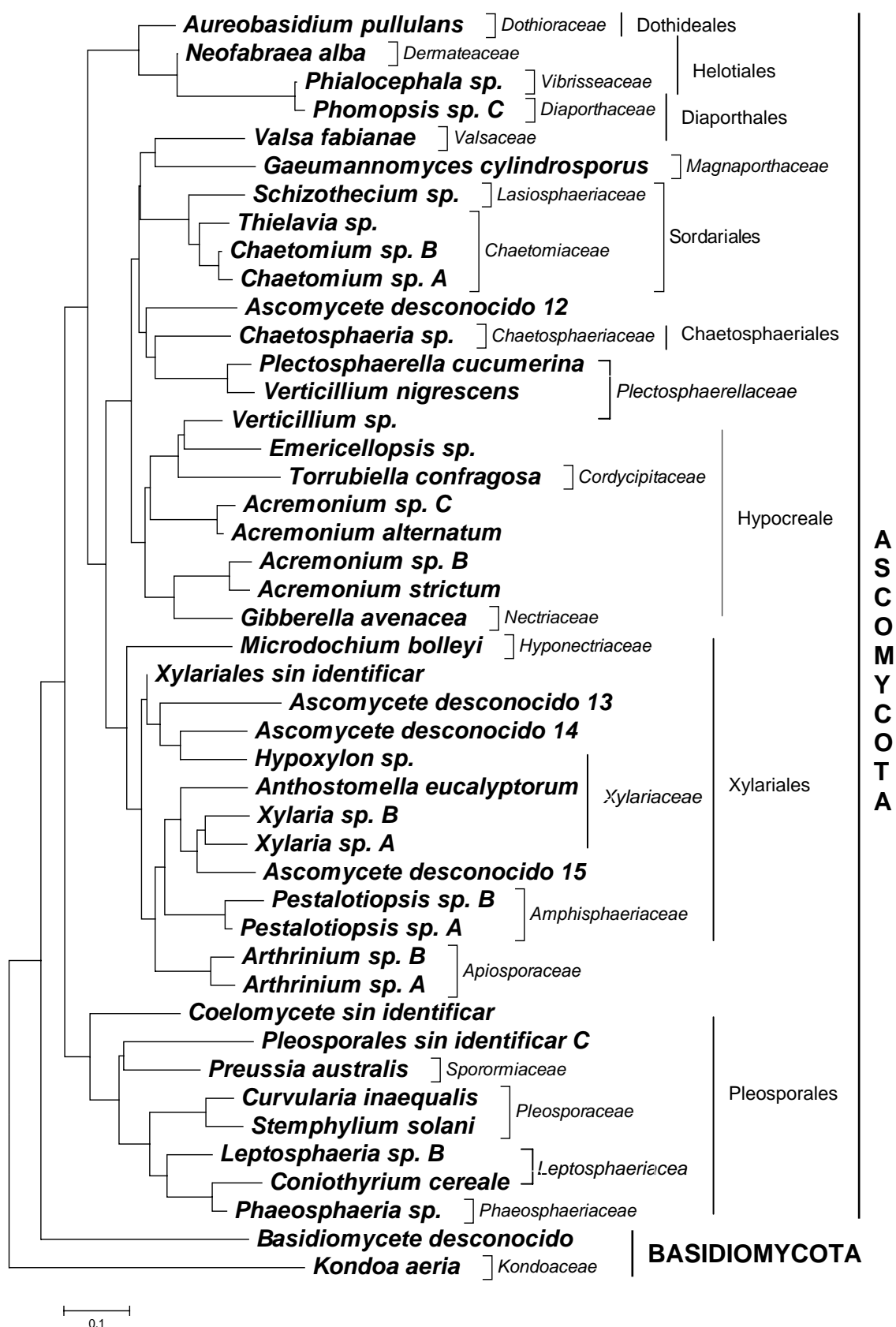


Figura 46. Dendrograma de las especies aisladas de *Elymus farctus* basado en la secuencia de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2. El dendrograma se realizó por el método Neighbour-Joining con la distancia calculada según el método Kimura 2- parámetros. Los corchetes indican familias y las líneas verticales órdenes y phylum. La barra de escala (0,1) significa 10 sustituciones cada 100 nucleótidos.

Tabla 19. Especies de endofitos aisladas exclusivamente de plantas de *Ammophila arenaria*.

N° REFE- RENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS		
					Hojas	Rizomas	Total
AM921701	Cultivo estéril	<i>Coniosporium</i> sp.	91,53	Ascomycete desconocido 1	19	3	22
-	<i>Arthrinium</i> sp.	n.s.	-	<i>Arthrinium</i> sp.	5	2	7
AM921702	Cultivo estéril	<i>Gliomastix murorum</i>	98,29	<i>Gliomastix murorum</i>	0	5	5
AM921703	Helotiales	<i>Heyderia abietis</i>	88,82	Helotiales sin identificar A	2	2	4
AM921735	Cultivo estéril	<i>Scutellinia</i> sp.	74,04	Ascomycete desconocido 2	0	4	4
AM921704	Cultivo estéril	<i>Cordyceps sinensis</i>	96,41	Sordariales sin identificar	4	0	4
AM921705	Cultivo estéril	<i>Lophodermium actinothyrium</i>	95,46	<i>Lophodermium</i> sp.	3	0	3
AM921738	Levadura sin identificar	<i>Cryptococcus victoriae</i>	100,00	<i>Cryptococcus victoriae</i>	0	2	2
AM921706	<i>Dactylaria</i> sp.	<i>Dactylaria</i> sp.	97,72	<i>Dactylaria</i> sp.	0	2	2
AM921707	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora oryzae</i>	97,84	<i>Nigrospora oryzae</i>	2	0	2
AM921708	<i>Periconiella</i> sp.	<i>Periconiella</i> sp.	94,59	<i>Periconiella</i> sp.	2	0	2
AM921709	<i>Stagonospora</i> sp.	<i>Stagonospora</i> sp.	98,31	<i>Stagonospora</i> sp.	2	0	2
AM921710	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i>	99,81	<i>Trichoderma viride</i>	2	0	2
AM921711	Cultivo estéril	Ascomycete de piedra caliza	89,26	Ascomycete desconocido 3	2	0	2
AM921739	Cultivo estéril	<i>Scolecobasidium variabile</i>	70,97	Ascomycete desconocido 4	0	2	2
AM921712	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	90,37	Ascomycete desconocido 5	2	0	2
-	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Sepedonium chlorinum</i>	71,91	<i>Acremonium</i> sp. A	0	1	1
AM921713	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	100,00	<i>Aspergillus niger</i>	0	1	1
AM921714	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus versicolor</i>	99,78	<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0	1
AM921736	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium globosum</i>	98,66	<i>Chaetomium globosum</i>	1	0	1
AM921740	Cultivo estéril	<i>Coprinellus radians</i>	97,76	<i>Coprinellus radians</i>	1	0	1
AM921715	Levadura sin identificar	<i>Debaryomyces hansenii</i>	97,37	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	1	1
AM921716	Cultivo estéril	<i>Engyodontium album</i>	99,81	<i>Engyodontium album</i>	1	0	1
AM921717	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	Hongo endofítico	96,41	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	0	1	1
AM921741	<i>Helgardia</i> sp.	<i>Helgardia anguioides</i>	99,78	<i>Helgardia anguioides</i>	1	0	1
AM921718	<i>Kabatiella</i> sp.	Hongo sin identificar	85,49	<i>Kabatiella</i> sp.	1	0	1
AM921719	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp.	98,17	<i>Leptosphaeria</i> sp. A	0	1	1
AM921720	<i>Lophiostoma</i> sp.	<i>Cercophora coprophila</i>	90,66	<i>Lophiostoma</i> sp.	1	0	1
AM921721	Cultivo estéril	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100,00	<i>Macrophomina phaseolina</i>	0	1	1
AM921742	<i>Meira</i> sp.	<i>Meira</i> sp.	98,99	<i>Meira</i> sp.	1	0	1
AM921743	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	98,67	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	0	1
-	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	n.s.	-	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	1	0	1

Tabla 19. Continuación.

Nº REFE- RENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	Nº DE AISLADOS		
					Hojas	Rizomas	Total
AM921722	<i>Phialemonium</i> sp.	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	99,79	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	1	0	1
AM921744	Cultivo estéril	<i>Phlebia radiata</i>	98,63	<i>Phlebia radiata</i>	1	0	1
AM921723	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	96,21	<i>Phomopsis</i> sp. A	0	1	1
AM921724	Cultivo estéril	<i>Phomopsis</i> sp.	96,58	<i>Phomopsis</i> sp. B	1	0	1
AM921725	Cultivo estéril	<i>Phyllosticta pyrolae</i>	98,62	<i>Phyllosticta pyrolae</i>	0	1	1
AM921726	Cultivo estéril	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	94,66	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	0	1	1
AM921727	Cultivo estéril	<i>Sarea</i> sp.	99,80	<i>Sarea</i> sp.	1	0	1
AM921728	Cultivo estéril	<i>Dothioraceae</i> sp.	99,81	<i>Sydowia polyspora</i>	1	0	1
AM921729	Pleosporales	Ascomycete sp.	95,63	Pleosporales sin identificar A	0	1	1
AM921730	Pleosporales	Hongo sin identificar	91,03	Pleosporales sin identificar B	0	1	1
AM921731	<i>Xylariaceae</i>	<i>Muscodora albus</i>	84,89	<i>Xylariaceae</i> sin identificar	1	0	1
AM921737	Cultivo estéril	<i>Dactylaria appendiculata</i>	93,08	Ascomycete desconocido6	0	1	1
AM921732	Cultivo estéril	<i>Zopfiella karachiensis</i>	93,32	Ascomycete desconocido7	0	1	1
AM921745	Cultivo estéril	<i>Trimmatostroma salinum</i>	91,08	Ascomycete desconocido8	1	0	1
AM921746	Cultivo estéril	<i>Preussia isomera</i>	76,99	Ascomycete desconocido 9	0	1	1
AM921733	Cultivo estéril	<i>Eutypa lata</i>	82,31	Ascomycete desconocido10	1	0	1
AM921734	Cultivo estéril	Hongo endofítico	80,95	Ascomycete desconocido11	1	0	1

Tabla 20. Especies de endofitos aisladas exclusivamente de plantas de *Elymus farctus*.

Nº REFE- RENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	Nº DE AISLADOS		
					Hojas	Rizomas	Total
AM922199	Cultivo estéril	Hongo sin identificar	90,64	Ascomycete desconocido 12	1	5	6
AM922200	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	97,46	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	3	0	3
AM922201	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria hypoxylon</i>	92,11	<i>Xylaria</i> sp. B	3	0	3
AM922202	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	99,44	<i>Chaetomium</i> sp. B	0	2	2
-	<i>Drechslera</i> sp.	n.s.	-	<i>Drechslera</i> sp.	0	2	2
AM922203	Cultivo estéril	Endofito foliar	75,38	Ascomycete desconocido 13	2	0	2
AM922204	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium alternatum</i>	96,51	<i>Acremonium</i> sp. C	1	0	1
AM922205	<i>Anthostomella</i> sp.	<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	98,01	<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	1	0	1
AM922206	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	100,00	<i>Arthrinium</i> sp. B	1	0	1
AM922225	Cultivo estéril	<i>Chaetosphaeria</i> sp.	95,25	<i>Chaetosphaeria</i> sp.	0	1	1
AM922221	Coelomycete	Endofito de raíces de <i>Epacris microphylla</i>	89,65	Coelomycete	1	0	1
AM922207	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Coniothyrium cereale</i>	100,00	<i>Coniothyrium cereale</i>	0	1	1
AM922208	<i>Emericellopsis</i> sp.	<i>Emericellopsis</i> sp.	98,34	<i>Emericellopsis</i> sp.	1	0	1
AM922209	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	99,44	<i>Gibberella avenacea</i>	0	1	1
AM922210	Cultivo estéril	<i>Hypoxylon perforatum</i>	97,66	<i>Hypoxylon</i> sp.	1	0	1
AM922224	Levadura	<i>Kondoa aeria</i>	99,62	<i>Kondoa aeria</i>	1	0	1
AM922211	Cultivo estéril	<i>Neofabraea alba</i>	100,00	<i>Neofabraea alba</i>	1	0	1
AM922212	Cultivo estéril	<i>Phialocephala</i> sp.	99,83	<i>Phialocephala</i> sp.	0	1	1
AM922213	Cultivo estéril	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	99,35	<i>Phomopsis</i> sp. C	0	1	1
AM922214	<i>Schizothecium</i> sp.	<i>Podospora tetraspora</i>	99,77	<i>Schizothecium</i> sp.	1	0	1
AM922215	<i>Cytospora</i> sp.	<i>Valsa fabianae</i>	100,00	<i>Valsa fabianae</i>	1	0	1
AM922222	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Verticillium nigrescens</i>	100,00	<i>Verticillium nigrescens</i>	0	1	1
AM922216	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Verticillium balanoides</i>	96,07	<i>Verticillium</i> sp.	0	1	1
AM922217	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	97,69	<i>Xylaria</i> sp. A	0	1	1
AM922218	Pleosporales	<i>Leptosphaeria contecta</i>	92,43	Pleosporales sin identificar C	0	1	1
AM922219	Xylariales	<i>Hypoxylon multifforme</i>	93,70	Xylariales sin identificar	1	0	1
AM922220	Cultivo estéril	<i>Nodulisporium</i> sp.	90,45	Ascomycete desconocido 14	0	1	1
AM922223	Cultivo estéril	<i>Plicaturopsis crispa</i>	77,96	Basidiomycete desconocido	1	0	1

Tabla 21. Especies de endofitos aisladas de hojas (H) y rizomas (R) de *Ammophila arenaria* (Aa) y *Elymus farctus* (Ef), así como el total (T) de aislados obtenido de cada hospedador.

N° REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	IDENTIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA	% IDENTIDAD FASTA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° AISLADOS					
					Aa			Ef		
					H	R	T	H	R	T
-	<i>Alternaria</i> sp.	n.s. ^a	-	<i>Alternaria</i> sp.	53	9	62	46	20	66
-	<i>Podospora</i> sp.	n.s.	-	<i>Podospora</i> sp.	13	4	17	13	4	17
-	<i>Acremonium</i> sp.	n.s.	-	<i>Acremonium</i> sp.	11	5	16	6	5	11
AM924149	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nectria mauritiicola</i>	94,27	<i>Acremonium</i> sp. B	10	0	10	1	3	4
AM924150	<i>Microdochium bolleyi</i>	<i>Microdochium</i> sp.	100,00	<i>Microdochium bolleyi</i>	0	8	8	1	4	5
-	<i>Penicillium</i> sp.	n.s.	-	<i>Penicillium</i> sp.	3	2	5	5	3	8
-	<i>Epicoccum nigrum</i>	n.s.	-	<i>Epicoccum nigrum</i>	6	0	6	5	0	5
AM924151	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp.	98,17	<i>Leptosphaeria</i> sp. B	0	3	3	0	8	8
-	<i>Cladosporium</i> sp.	n.s.	-	<i>Cladosporium</i> sp.	3	2	5	6	0	6
AM924152	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium strictum</i>	99,82	<i>Acremonium strictum</i>	2	2	4	2	4	6
AM924153	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Cordyceps bassiana</i>	100,00	<i>Cordyceps bassiana</i>	4	0	4	3	2	5
AM924154	<i>Gaeumannomyces</i> sp.	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	99,28	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	0	5	5	0	1	1
AM924155	Cultivo estéril	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	98,80	<i>Pestalotiopsis</i> sp. B	3	0	3	2	1	3
AM924156	<i>Thielavia</i> sp.	<i>Thielavia coactilis</i>	95,71	<i>Thielavia</i> sp.	1	0	1	3	2	5
AM924157	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia inaequalis</i>	100,00	<i>Curvularia inaequalis</i>	4	0	4	1	1	2
AM924158	Helotiales	Ericoid mycorrhizal sp.	92,23	Helotiales sin identificar B	0	1	1	1	3	4
AM924159	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	100,00	<i>Arthrinium</i> sp. A	1	1	2	2	0	2
AM924160	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium alternatum</i>	99,10	<i>Acremonium alternatum</i>	1	0	1	0	2	2
AM924161	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100,00	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	1	2	1	1	2
AM924162	Cultivo estéril	<i>Stemphylium solani</i>	99,09	<i>Stemphylium solani</i>	2	0	2	1	1	2
AM924163	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Torrubiella confragosa</i>	99,65	<i>Torrubiella confragosa</i>	1	1	2	2	0	2
-	<i>Chaetomium</i> sp.	n.s.	-	<i>Chaetomium</i> sp.	1	1	2	1	1	2
AM924164	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100,00	<i>Pestalotiopsis</i> sp. A	1	0	1	0	1	1
AM924165	<i>Plectosphaerella</i> sp.	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	99,06	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	0	1	1	0	1	1
AM924166	Cultivo estéril	<i>Preussia australis</i>	96,36	<i>Preussia australis</i>	1	1	2	1	1	2
AM924167	Cultivo estéril	<i>Emarcea castanopsidicola</i>	87,11	Ascomycete desconocido 15	1	0	1	0	1	1

Nota. ^a Sólo un aislado de *Alternaria* fue secuenciado. Su secuencia lo identificó como *Lewia infectoria*, con un 98,2% de homología.

Tabla 22. Distribución taxonómica de las especies endofíticas identificadas en *A. arenaria* y *E. farctus*.

<i>Ammophila arenaria</i>			<i>Elymus farctus</i>		
PHYLUM/Orden/ Familia	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES	PHYLUM/Orden/ Familia	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES
ASCOMYCOTA			ASCOMYCOTA		
Botryosphaeriales			Capnodiales		
<i>Botryosphaeriaceae</i>	2	2	<i>Davidiellaceae</i>	1	1
Capnodiales			Chaetosphaeriales		
<i>Davidiellaceae</i>	1	1	<i>Chaetosphaeriaceae</i>	1	1
<i>Mycosphaerellaceae</i>	1	1	Diaporthales		
Diaporthales			<i>Diaporthaceae</i>	1	1
<i>Diaporthaceae</i>	1	2	<i>Valsaceae</i>	1	1
Dothideales			Dothideales		
<i>Dothioraceae</i>	3	3	<i>Dothioraceae</i>	1	1
Eurotiales			Eurotiales		
<i>Trichocomaceae</i>	2	4	<i>Trichocomaceae</i>	1	1
Helotiales			Helotiales		
Incertae sedis	2	2	<i>Dermataceae</i>	1	1
Sin identificar	¿	2	<i>Vibrissaceae</i>	1	1
Hypocreales			Hypocreales		
<i>Cordycipitaceae</i>	3	3	<i>Cordycipitaceae</i>	2	2
<i>Hypocreaceae</i>	1	1	<i>Nectriaceae</i>	1	1
Incertae sedis	2	6	Incertae sedis	2	6
Pleosporales			Pleosporales		
<i>Leptosphaeriaceae</i>	1	2	<i>Leptosphaeriaceae</i>	2	2
<i>Lophiostomaceae</i>	1	1	<i>Phaeosphaeriaceae</i>	1	1
<i>Phaeosphaeriaceae</i>	1	2	<i>Pleosporaceae</i>	5	5
<i>Pleosporaceae</i>	4	4	<i>Sporormiaceae</i>	1	1
<i>Sporormiaceae</i>	1	1	Sin identificar	¿	1
Incertae sedis	1	1	Sordariales		
Sin identificar	¿	2	<i>Chaetomiaceae</i>	2	4
Rhytismatales			<i>Lasiophaeriaceae</i>	2	2
<i>Rhytismataceae</i>	1	1	Xylariales		
Sordariales			<i>Amphisphaeriaceae</i>	1	2
<i>Cephalothecaceae</i>	1	1	<i>Xylariaceae</i>	3	4
<i>Chaetomiaceae</i>	2	3	Incertae sedis	1	1
<i>Lasiophaeriaceae</i>	2	2	Sin identificar	¿	1
Sin identificar	¿	1	Incertae sedis		
Trichosphaeriales			<i>Apiosporaceae</i>	1	2
Incertae sedis	1	1	<i>Magnaporthaceae</i>	1	1
Xylariales			<i>Plectosphaerellaceae</i>	2	3
<i>Amphisphaeriaceae</i>	1	2	Coelomycetes	¿	1
Incertae sedis	1	1	Sin identificar	¿	4
Sin identificar	1	1	Total	35	52
Incertae sedis			BASIDIOMYCOTA		
<i>Apiosporaceae</i>	1	2	Agaricostilbales		
<i>Magnaporthaceae</i>	1	1	<i>Kondoaceae</i>	1	1
<i>Plectosphaerellaceae</i>	1	1	Sin identificar	¿	1
Incertae sedis	2	2	Total	1	2
Desconocidos	¿	12	TOTAL		
Total	42	71		36	54
BASIDIOMYCOTA					
Agaricales					
<i>Psathyrellaceae</i>	1	1			
Polyporales					
<i>Meruliaceae</i>	1	1			
Tremellales					
<i>Tremellaceae</i>	1	1			
Incertae sedis					
Incertae sedis	1	1			
Total	4	4			
TOTAL	46	75			

4.3.2. Abundancia y diversidad biológica.

Excluyendo las especies desconocidas, la micobiota endofítica de ambas gramíneas está constituida por 58 géneros, siendo los 8 más abundantes *Alternaria* (128 aislados), *Acremonium* (51), *Podospora* (34), *Microdochium* (13), *Penicillium* (13), *Cladosporium* (11), *Epicoccum* (11), y *Leptosphaeria* (11) (Figura 47), los cuales abarcan el 56,3% del total de aislados obtenidos.

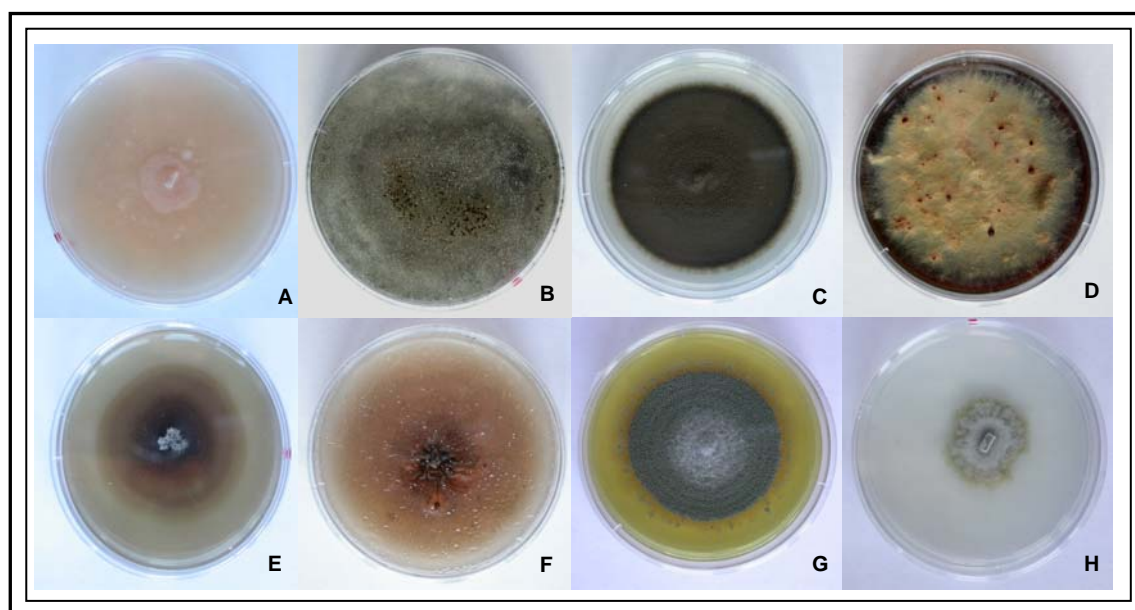


Figura 47. Cultivos en PDA de los géneros más abundantes aislados de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. **A.** *Acremonium*. **B.** *Alternaria*. **C.** *Cladosporium*. **D.** *Epicoccum*. **E.** *Leptosphaeria*. **F.** *Microdochium*. **G.** *Penicillium*. **H.** *Podospora*.

Las especies dominantes de la micobiota de *Ammophila* han sido *Alternaria* sp. (62 aislados), Ascomycete desconocido 1 (22), *Podospora* sp. (17), *Acremonium* sp. (16), y *Acremonium* sp. B (10), mientras que en *Elymus* han sido: *Alternaria* sp. (66 aislados), *Podospora* sp. (17), *Acremonium* sp. (11), *Leptosphaeria* sp. B (8) y *Penicillium* sp. (8).

Cuarenta y seis de las 103 especies diferentes identificadas en ambas plantas fueron plurales, representadas por más de un aislado; por tanto, el 55,3% de las especies fueron únicas. La proporción de especies únicas fue muy similar en ambos hospedadores, el 52% de las especies observadas en *Ammophila* y el 51,8% de las especies de *Elymus*.

El índice de diversidad de Shannon fue mayor para la micobiota de *Ammophila* ($H' = 3,69$) que para la de *Elymus* ($H' = 3,31$); calculado para cada una de las 12 localidades del estudio, también dio un valor mayor para *Ammophila* ($H' = 3,58/\text{localidad}$) que para *Elymus* ($H' = 3,26/\text{localidad}$).

Las curvas de acumulación del total de especies de cada gramínea fueron no asintóticas, lo que indica que la diversidad endofítica aumentaría al incrementarse el número de plantas analizadas (Figura 48, curvas continuas). En contraste, las curvas basadas en las especies plurales fueron asintóticas (Figura 48, curvas discontinuas), al igual que sucedió en los anteriores hospedadores del estudio, *Dactylis glomerata* y *Holcus lanatus*, lo que indica que la mayoría de especies comúnmente asociadas a estas gramíneas han sido aisladas. La pendiente de los 20 últimos puntos de las curvas de acumulación de todas las especies tuvo un valor de 0,55 para *Ammophila* y de 0,41 para *Elymus*. Estos datos sugieren que por cada dos o tres plantas más analizadas, una o más especies de endofitos podrían ser aisladas, y estas especies probablemente serían únicas.

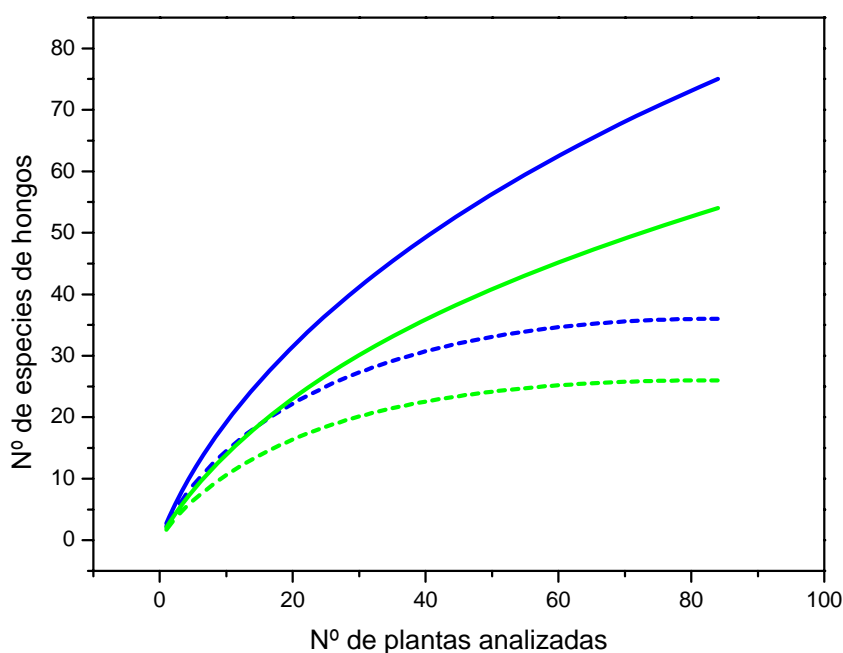


Figura 48. Curvas de acumulación de especies para *Ammophila arenaria* (azul) y *Elymus farctus* (verde). Las curvas del total de especies (líneas continuas) muestran la relación entre el nº de plantas analizadas y el nº total de especies de hongos identificadas. Las curvas de las especies plurales (líneas discontinuas), muestran la relación entre el nº de plantas analizadas y las especies representadas por más de un aislado.

Se calcularon una serie de estimadores de la riqueza total de especies, basados en la incidencia de especies de cada planta (Tabla 23). Todos los estimadores produjeron curvas de acumulación de especies no asintóticas para ambos hospedadores, similares a las obtenidas para la micobiota de *Dactylis glomerata* (Figura 30, página 76), con unos valores mayores para *Ammophila* que para *Elymus*. Para el total de aislados, los valores máximos fueron obtenidos con el estimador Jackknife 2 (136 especies en *Ammophila* y 100 en *Elymus*) y los mínimos con Bootstrap (92 especies en *Ammophila* y 66 para *Elymus*). Al ser las curvas de acumulación de especies de todos los estimadores no asintóticas, estos números deben considerarse como los valores mínimos del número total de especies que podrían encontrarse en cada una de las gramíneas (Gotelli y Colwell, 2001).

Tabla 23. Estimadores de la riqueza total de especies en *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*.

ESTIMADORES	<i>Ammophila arenaria</i>			<i>Elymus farctus</i>		
	Hojas	Rizomas	Total	Hojas	Rizomas	Total
ICE	108,43	67,32	134,75	76,03	72,37	94,1
Chao 2	84,95	58,75	118,07	74,04	92,06	91,35
Jackknife 1	78,67	58,75	113,54	57,74	56,74	81,67
Jackknife 2	96,36	70,57	136,18	74,39	75,32	100,32
Bootstrap	62,76	46,98	91,63	44,88	43,69	65,71
Michaelis-Menten	75,92	113,33	121,52	67,28	61,37	79,02

La micobiota endofítica de cada especie de gramínea fue dominada por especies generalistas, las cuales infectan a ambas plantas (Tabla 21), ya que las 26 especies comunes incluyen 343 aislados, es decir, el 71% del total. Estas especies generalistas han sido aisladas en varias localidades del estudio (Tabla 24). En *Ammophila*, 9 de las 12 especies más abundantes fueron generalistas y estaban representadas por 134 aislados, el 49,6% del total de aislados identificados en esta planta. En *Elymus*, 11 de las 12 especies más abundantes fueron generalistas, representadas por 142 aislados, y siendo el 66,7% del total de aislados identificados en *Elymus*.

Curiosamente, la especie Ascomycete desconocido 1, una de las más abundantes en el estudio, con 22 aislados, fue aislada únicamente de plantas de *Ammophila* y podría tratarse de un hongo específico de esta gramínea.

Tabla 24. Especies de endofitos comunes a *Ammophila arenaria* (A) y *Elymus farctus* (E) y localidades donde han sido aisladas.

ESPECIES DE ENDOFITOS	LOCALIDADES												TO-TAL
	Da	Db	Esp	Ee	Eo	Le	Lo	M	P	V	Ve	Vo	
<i>Acremonium alternatum</i>	-	-	-	-	-	E	E	-	A	-	-	-	3
<i>Acremonium strictum</i>	-	-	-	-	-	A,E	A	E	A	A,E	-	E	6
<i>Acremonium</i> sp. B	A	E	A	A	-	-	A,E	E	A	A	A,E	-	9
<i>Acremonium</i> sp.	A,E	A,E	-	E	-	-	A	-	E	A,E	A	A	8
<i>Altenaria</i> sp.	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	A,E	12
<i>Arthrinium</i> sp. A	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	E	2
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	E	-	A	-	-	-	-	A	-	-	3
<i>Chaetomium</i> sp.	-	-	-	-	E	A	-	-	-	-	-	-	2
<i>Cladosporium</i> sp.	E	A,E	-	E	-	-	A	A,E	-	-	E	A	7
<i>Cordyceps bassiana</i>	-	-	-	A,E	A,E	-	-	-	-	-	-	A,E	3
<i>Curvularia inaequalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	A,E	-	A	-	-	2
<i>Epicoecum nigrum</i>	A	-	-	-	-	A,E	A	A,E	E	E	-	E	7
<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	A	-	A	-	-	E	-	A	A	-	-	-	5
<i>Leptosphaeria</i> sp. B	A	-	-	E	E	A	E	E	A	-	-	-	7
<i>Microdochium bolleyi</i>	A	-	-	A	E	-	E	A	-	E	A	E	8
<i>Penicillium</i> sp.	A,E	-	E	E	-	-	-	A,E	-	A	A	A,E	7
<i>Pestalotiopsis</i> sp. A	-	-	-	-	A	E	-	-	-	-	-	-	2
<i>Pestalotiopsis</i> sp. B	-	-	E	-	-	-	-	A	E	E	A	A	6
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	A	-	2
<i>Podospora</i> sp.	A	A,E	E	-	-	A,E	A,E	A	A	E	A,E	A,E	10
<i>Preussia australis</i>	-	-	-	-	A,E	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Stemphylium solani</i>	-	A,E	-	-	-	-	A,E	-	-	-	-	-	2
<i>Thielavia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	A,E	-	2
<i>Torrubiella confragosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	E	2
Helotial desconocido B	A	-	-	E	-	-	-	E	-	A	-	-	4
Ascomycete desconocido 15	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	A	2

Nota. Localidades: Da: Doniños, zona A; Db: Doniños, zona B; Esp: Espasante; Ee: Esteiro, zona este; Eo: Esteiro, zona oeste; Le: Lago, zona este; Lo: Lago, zona oeste; M: Morouzos; P: Pantín; V: Vilarube; Ve: Vilarube, zona este; Vo: Vilarube, zona oeste.

4.3.3. Comparación entre hospedadores.

En la tabla 25 se indica el número de especies de endofitos de cada hospedador aislados en cada localidad y su distribución entre hojas y raíces. La media del número de especies encontradas en cada localidad fue significativamente mayor para *Ammophila* (6,25 especies/localidad) que para *Elymus* (4,5 especies/localidad) ($t = -2,1249$; $p < 0,05$). El índice de Shannon también fue significativamente superior para *Ammophila* ($H' = 3,58$) que para *Elymus* ($H' = 3,26$) ($t = -1,7772$; $p = 0,08937$).

Tabla 25. Número de especies de hongos identificadas en hojas y rizomas de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus* de 12 localidades de playas de la costa norte de Galicia, España. En cada localidad, los endofitos fueron aislados de muestras de hojas de 7 plantas y rizomas de 4 plantas de cada especie hospedadora. El índice de diversidad de Shannon (H') fue calculado para el total de especies de endofitos observadas en cada localidad y también para el total de especies de cada gramínea.

LOCALIDADES	<i>Ammophila arenaria</i>				<i>Elymus farctus</i>			
	Nº ESPECIES OBSERVADAS				Nº ESPECIES OBSERVADAS			
	Hojas	Rizomas	Total*	H'	Hojas	Rizomas	Total*	H'
Doniños, A	9	8	13	2,5	4	1	5	2,23
Doniños, B	8	5	10	3,02	5	1	5	2,72
Espasante	4	3	8	3,29	5	1	5	2,97
Esteiro, A	5	3	8	3,47	6	8	12	3,13
Esteiro, B	10	3	12	3,6	5	8	9	3,26
Lago, A	5	7	9	3,69	5	4	9	3,38
Lago, B	12	4	14	3,76	10	6	16	3,45
Morouzos	12	7	17	3,82	6	9	11	3,51
Pantín	5	6	11	3,89	2	4	5	3,56
Villarrube, A	10	4	14	3,93	7	9	14	3,6
Villarrube, B	10	10	18	3,96	6	2	7	3,62
Villarrube, C	14	2	15	4	11	6	13	3,66
TOTAL	51	38	75	3,69	36	35	54	3,31
Media por localidad	4,25	3,17	6,25	3,58	3	2,92	4,5	3,26
Media por planta	0,61	0,79	0,89	-	0,43	0,73	0,64	-

Nota. * Los totales no se corresponden con la suma de las filas anteriores debido a que hay especies comunes a varias localidades.

4.3.4. Comparación entre hojas y rizomas.

En *Ammophila*, la diferencia entre las media de especies aisladas de hojas fue significativamente mayor (4,25 especies/localidad) que la de las raíces (3,17 especies/localidad) ($t = -2,9618$; $p < 0,05$). En *Elymus* la diferencia entre las medias de las especies aisladas de hojas y raíces no fue estadísticamente significativas ($t = -0,9358$; $p > 0,05$).

Si comparamos las especies aisladas de cada parte de la planta de ambos hospedadores, las diferencias entre las medias de las especies aisladas de hojas en cada localidad fueron significativamente mayores para *Ammophila* (4,25 especies/localidad) que para *Elymus* (3 especies/localidad) ($t = -2,2546$; $p < 0,05$). En el caso de los rizomas, las diferencias entre ambas gramíneas no fueron estadísticamente significativas ($t = -0,2162$; $p > 0,05$).

Catorce especies de *Ammophila* y 17 de *Elymus* fueron aisladas tanto en hojas como en rizomas. Debido a que en general el número de aislados de cada especie fue bajo (sólo del 25% de las especies se obtuvieron más de 5 aislados), es imposible asegurar si algunas especies son exclusivas de hojas o de rizomas; de todos modos, especies como *Gliomastix murorum* (5 aislados en rizomas de *Ammophila*), *Epicoccum nigrum* (aislado sólo de hojas, 6 aislados en *Ammophila* y 5 en *Elymus*), *Leptosphaeria* sp. B (aislado solamente de rizomas, 3 aislados en *Ammophila* y 8 en *Elymus*), y *Gaeumannomyces cylindrosporus* (aislado únicamente de rizomas, 5 aislados en *Ammophila* y 1 en *Elymus*), fueron encontradas exclusivamente en un órgano de la planta (Figura 49).

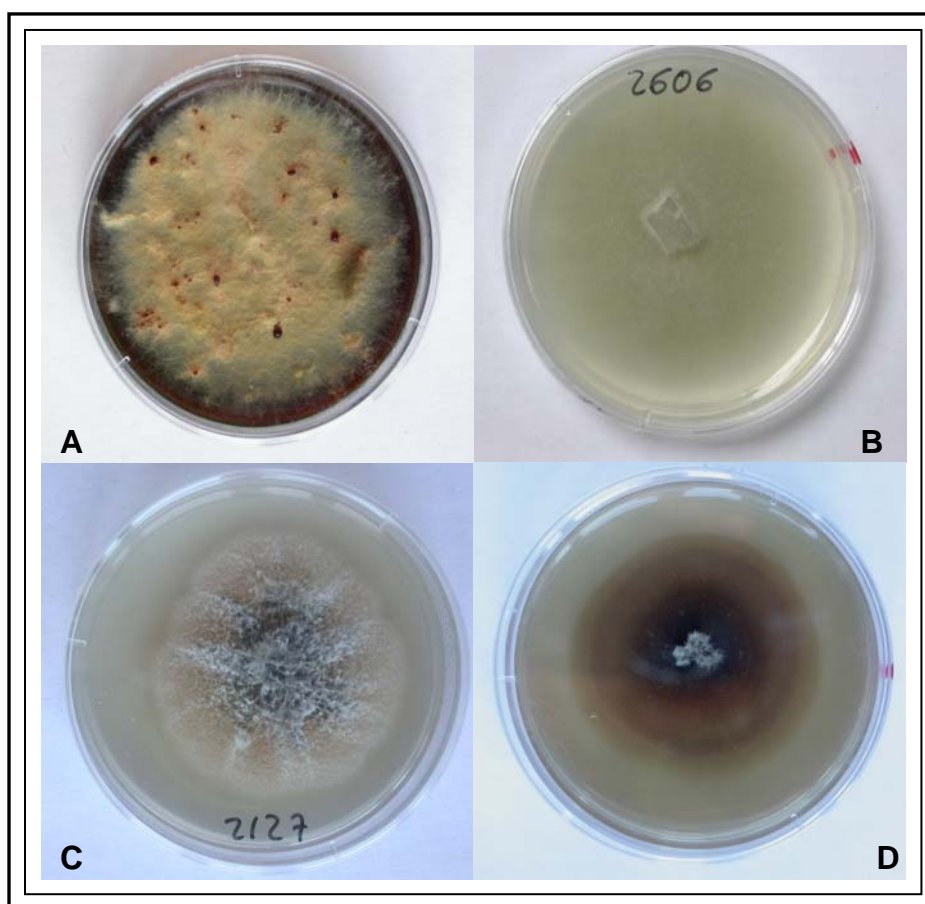


Figura 49. Cultivos en PDA de las especies aisladas de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus* que podrían ser específicas de un órgano de la planta. **A.** *Epicoccum nigrum*. **B.** *Gaeumannomyces cylindrosporus*. **C.** *Gliomastix murorum*. **D.** *Leptosphaeria* sp.

En la tabla 25 se indica el número de especies identificadas en hojas y rizomas de muestras de hojas de 7 plantas y muestras de 4 rizomas de cada localidad. Para comprobar si el número de especies endofíticas en hojas era estadísticamente diferente del número en

rizomas, se analizaron los datos de cuatro muestras de hojas y cuatro de rizomas de cada localidad. No se observaron diferencias significativas entre ambos órganos en *Ammophila* (6,58 especies en hojas y 5,08 en rizomas. $t = -1,6912$; $p > 0,05$) ni en *Elymus* (3 especies en hojas y 2,92 en rizomas. $t = -0,9358$; $p > 0,05$).

4.3.5. Efectos geográficos en la composición de especies.

Como era esperado, debido al alto número de especies únicas, la mayoría de las especies sólo se aislaron de una localidad. La especie más cosmopolita fue *Alternaria* sp., aislada de ambos hospedadores y en las 12 localidades de muestreo. Otros taxones encontrados en 5 o más localidades fueron *Podospora* sp. (10 localidades), *Acremonium* sp. (8), *Acremonium* sp. B (7), *Penicillium* sp. (7), *Cladosporium* sp. (5), *Epicoccum* sp. (5) (Tabla 24) (Figura 50), y Ascomycete desconocido 1 (5), aislado únicamente en *Ammophila*.

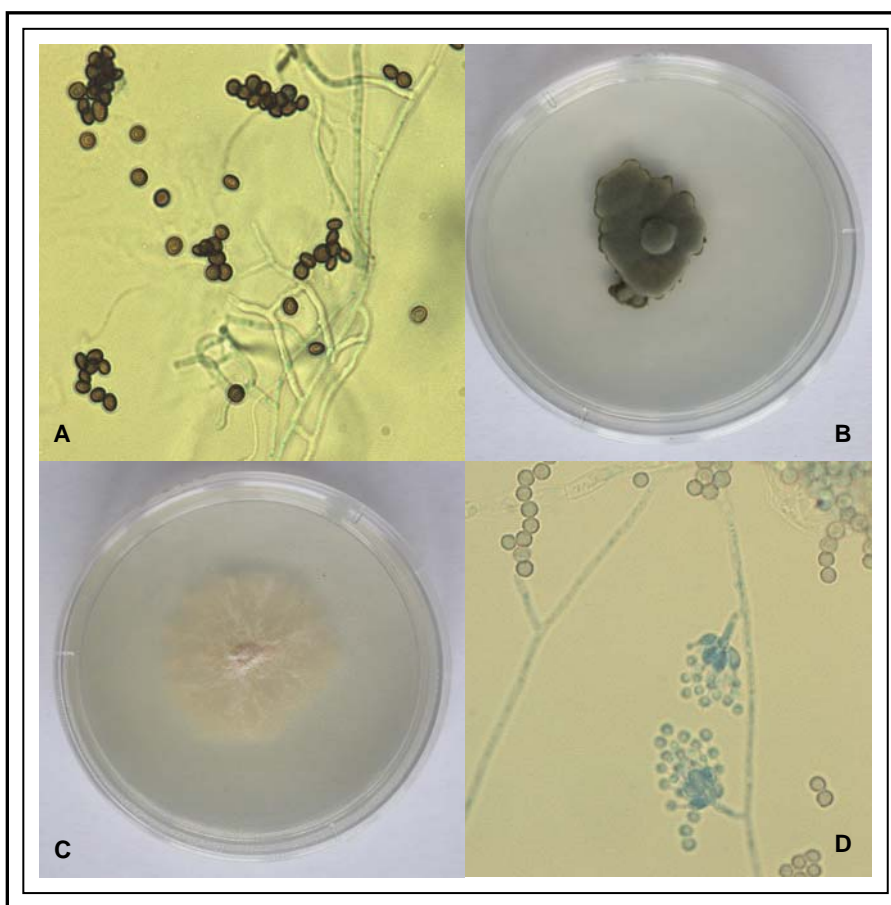


Figura 50. Fotografías a microscopía óptica y de cultivos en PDA de algunos de las especies más cosmopolitas aisladas de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. **A.** *Cladosporium* sp. **B.** *Podospora* sp. **C.** Ascomycete desconocido 1. **D.** *Penicillium* sp.

La similitud entre las micobiotas de cada órgano entre cada par de localidades se estimó mediante el índice de Jaccard (Tabla 26). En general, la similitud entre localidades fue baja para los 2 hospedadores en hojas y en rizomas.

Tabla 26. Similitud estimada mediante el índice de Jaccard de la composición de la micobiota foliar (negro) y de rizomas (azul) de *Ammophila arenaria* (Aa) y *Elymus farctus* (Ef), en las 12 localidades a estudio.

Aa	Da	Db	Esp	Ee	Eo	Le	Lo	M	P	V	Ve	Vo
Da		0,214(3) ^a	0,182(2)	0,167(2)	0,118(2)	0,273(3)	0,313(5)	0,167(3)	0,273(3)	0,267(4)	0,267(4)	0,211(4)
Db	0,18(2) ^a		0,091(1)	0,083(1)	0,2(3)	0,083(1)	0,25(4)	0,053(1)	0,083(1)	0,125(2)	0,125(2)	0,158(3)
Esp	0,1(1)	0(0)		0,286(2)	0,167(2)	0,125(1)	0,143(2)	0,067(1)	0,286(2)	0,167(2)	0,167(2)	0,059(1)
Ee	0,1(1)	0(0)	0(0)		0,25(3)	0,111(1)	0,133(2)	0,063(1)	0,25(2)	0,154(2)	0,154(2)	0,118(2)
Eo	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		0,071(1)	0,1(2)	0,048(1)	0,071(1)	0,111(2)	0,111(2)	0,143(3)
Le	0,071(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		0,214(3)	0,214(3)	0,25(2)	0,071(1)	0,154(2)	0,118(2)
Lo	0(0)	0,125(1)	0(0)	0,167(1)	0(0)	0,1(1)		0,2(4)	0,308(4)	0,1(2)	0,158(3)	0,238(5)
M	0,154(2)	0,091(1)	0,111(1)	0,111(1)	0(0)	0,077(1)	0,1(1)		0,133(2)	0,158(3)	0,158(3)	0,238(5)
P	0,167(2)	0(0)	0,125(1)	0,125(1)	0(0)	0,083(1)	0,111(1)	0,083(1)		0,154(2)	0,25(3)	0,118(2)
V	0,091(1)	0,125(1)	0(0)	0,167(1)	0(0)	0,1(1)	0,143(1)	0(0)	0,111(1)		0,25(4)	0,143(3)
Ve	0,286(4)	0,25(3)	0(0)	0,083(1)	0(0)	0,063(1)	0(0)	0,063(1)	0(0)	0,077(1)		0,2(4)
Vo	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	

Nota. ^a Número de especies en común entre ambas localidades. Localidades: Da: Doniños, zona A; Db: Doniños, zona B; Esp: Espasante; Ee: Esteiro, zona este; Eo: Esteiro, zona oeste; Le: Lago, zona este; Lo: Lago, zona oeste; M: Morouzoz; P: Pantín; V: Vilarube; Ve: Vilarube, zona este; Vo: Vilarube, zona oeste.

Ef	Da	Db	Esp	Ee	Eo	Le	Lo	M	P	V	Ve	Vo
Da		0,5(3) ^a	0,286(2)	0,25(2)	0,125(1)	0,125(1)	0,077(1)	0,25(2)	0,2(1)	0,1(1)	0,25(2)	0,154(2)
Db	1(1) ^a		0,25(2)	0,222(2)	0,111(1)	0,25(2)	0,154(2)	0,222(2)	0,167(1)	0,2(2)	0,375(3)	0,143(2)
Esp	0(0)	0(0)		0,1(1)	0,111(1)	0,25(2)	0,154(2)	0,1(1)	0,167(1)	0,2(2)	0,222(2)	0,231(3)
Ee	0,125(1)	0,125(1)	0(0)		0,222(2)	0,1(1)	0,067(1)	0,2(2)	0,143(1)	0(0)	0,2(2)	0,133(2)
Eo	0(0)	0(0)	0(0)	0,143(2)		0,111(1)	0,071(1)	0,1(1)	0,167(1)	0(0)	0,1(1)	0,143(2)
Le	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		0,25(3)	0,222(2)	0,4(2)	0,2(2)	0,222(2)	0,333(4)
Lo	0(0)	0(0)	0(0)	0,077(1)	0,167(2)	0,111(1)		0,067(1)	0,091(1)	0,063(1)	0,231(3)	0,235(4)
M	0(0)	0(0)	0(0)	0,308(4)	0,214(3)	0,083(1)	0,154(2)		0,333(2)	0,083(1)	0,2(2)	0,133(2)
P	0,25(1)	0,25(1)	0(0)	0,2(2)	0,091(1)	0(0)	0(0)	0,083(1)		0,125(1)	0,143(1)	0,182(2)
V	0(0)	0(0)	0(0)	0,063(1)	0,133(2)	0,083(1)	0,071(1)	0,125(2)	0,083(1)		0,182(2)	0,125(2)
Ve	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0,143(1)	0,1(1)	0(0)	0(0)		0,214(3)
Vo	0(0)	0(0)	0(0)	0,167(2)	0,077(1)	0,111(1)	0(0)	0,25(3)	0,111(1)	0,154(2)	0,143(1)	

Nota. ^a Número de especies en común entre ambas localidades. Localidades: Da: Doniños, zona A; Db: Doniños, zona B; Esp: Espasante; Ee: Esteiro, zona este; Eo: Esteiro, zona oeste; Le: Lago, zona este; Lo: Lago, zona oeste; M: Morouzoz; P: Pantín; V: Vilarube; Ve: Vilarube, zona este; Vo: Vilarube, zona oeste.

También se estimó la similitud en el subconjunto de las especies identificadas en más de una localidad (Tabla 27), que fue mayor en plantas de *Ammophila* de diferentes localidades (0,172) que en *Elymus* ($J=0,068$), o que entre ambos hospedadores en la misma localidad (0,120).

Tabla 27. Similitud en la composición del conjunto de especies aisladas en más de una localidad de *Ammophila arenaria* (rojo) y *Elymus farctus* (verde).

	Da	Db	Esp	Ee	Eo	Le	Lo	M	P	V	Ve	Vo
Da		0,214(3) ^b	0,182(2)	0,167(2)	0,118(2)	0,273(3)	0,313(5)	0,167(3)	0,273(3)	0,267(4)	0,267(4)	0,211(4)
Db	0,182(2) ^b		0,091(1)	0,083(1)	0,2(3)	0,083(1)	0,25(4)	0,053(1)	0,083(1)	0,125(2)	0,125(2)	0,158(3)
Esp	0,1(1)	0(0)		0,286(2)	0,167(2)	0,125(1)	0,143(2)	0,067(1)	0,286(2)	0,167(2)	0,167(2)	0,059(1)
Ee	0,1(1)	0(0)	0(0)		0,25(3)	0,111(1)	0,133(2)	0,063(1)	0,25(2)	0,154(2)	0,154(2)	0,118(2)
Eo	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		0,071(1)	0,1(2)	0,048(1)	0,071(1)	0,111(2)	0,111(2)	0,143(3)
Le	0,071(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		0,214(3)	0,214(3)	0,25(2)	0,071(1)	0,154(2)	0,118(2)
Lo	0(0)	0,125(1)	0(0)	0,167(1)	0(0)	0,1(1)		0,2(4)	0,308(4)	0,1(2)	0,158(3)	0,238(5)
M	0,154(2)	0,091(1)	0,111(1)	0,111(1)	0(0)	0,077(1)	0,1(1)		0,133(2)	0,158(3)	0,158(3)	0,238(5)
P	0,167(2)	0(0)	0,125(1)	0,125(1)	0(0)	0,083(1)	0,111(1)	0,083(1)		0,154(2)	0,25(3)	0,118(2)
V	0,091(1)	0,125(1)	0(0)	0,167(1)	0(0)	0,1(1)	0,143(1)	0(0)	0,111(1)		0,25(4)	0,143(3)
Ve	0,286(4)	0,25(3)	0(0)	0,083(1)	0(0)	0,063(1)	0(0)	0,063(1)	0(0)	0,077(1)		0,2(4)
Vo	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	

Nota. ^a Número de especies por localidad. ^b Número de especies en común entre ambas localidades. Localidades: Da: Doniños, zona A; Db: Doniños, zona B; Esp: Espasante; Ee: Esteiro, zona este; Eo: Esteiro, zona oeste; Le: Lago, zona este; Lo: Lago, zona oeste; M: Morouzos; P: Pantín; V: Vilarube; Ve: Vilarube, zona este; Vo: Vilarube, zona oeste.

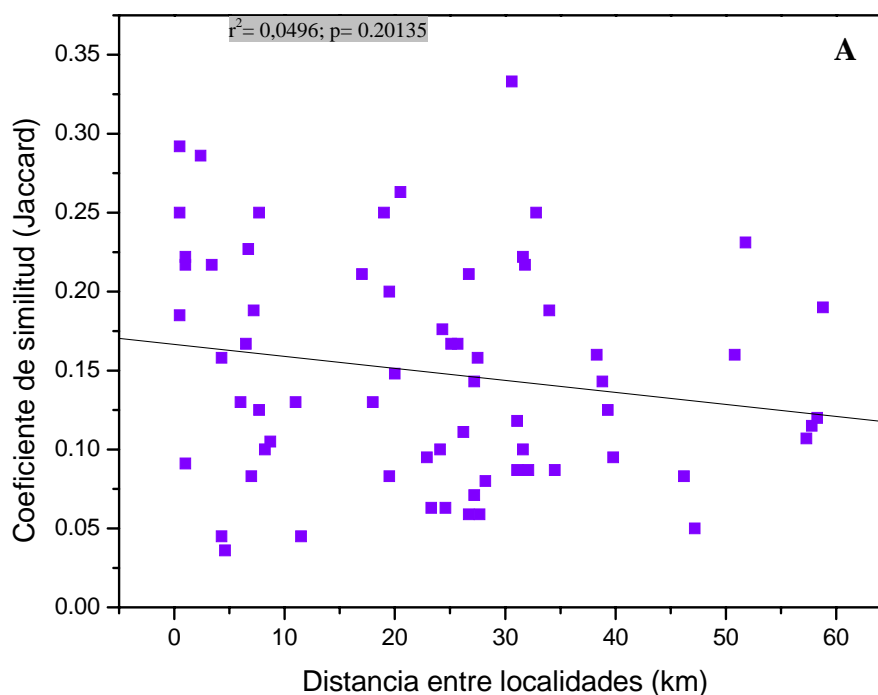
Además se estimó la similitud entre el conjunto de especies aisladas de hojas y rizomas en más de una localidad del estudio (Tabla 28), siendo mayores las diferencias entre la similitud de las hojas entre los 2 hospedadores en la misma localidad ($J=0,191$) que entre los rizomas en ambos hospedadores y en la misma localidad ($J=0,084$), o que entre las especies de ambos órganos y hospedadores en distintas localidades ($J=0,157$), lo que implica que la influencia de la localidad es posiblemente un factor más importante en la composición de la micobiota que el nivel de preferencia de los hongos por uno u otro hospedador.

Tabla 28. Similitud estimada mediante el índice de Jaccard entre la composición de la micobiota foliar (verde) y de rizomas (azul) de *Ammophila arenaria* (Aa) y *Elymus farctus* (Ef), de las especies aisladas en más de una localidad de las 12 a estudio.

HOSPE-DADOR	LOCALIDADES												Total
	Da	Db	Esp	Ee	Eo	Le	Lo	M	P	V	Ve	Vo	
Aa / Ef	0,2 0,167	0,286 0,2	0,167 0	0,4 0	0,143 0	0,167 0,2	0,182 0	0,111 0,1	0,2 0	0 0,2	0,222 0,143	0,214 0	0,191 0,084
TOTAL	0,154	0,333	0	0,091	0,1	0,375	0,125	0,214	0	0,125	0,154	0,214	0,157

Nota. Localidades: Da: Doniños, zona A; Db: Doniños, zona B; Esp: Espasante; Ee: Esteiro, zona este; Eo: Esteiro, zona oeste; Le: Lago, zona este; Lo: Lago, zona oeste; M: Morouzos; P: Pantín; V: Vilarube; Ve: Vilarube, zona este; Vo: Vilarube, zona oeste.

Los valores de similitud de la composición de la micobiota foliar de cada gramínea en todos los posibles pares de localidades se ajustaron a una distribución normal, tanto para *Ammophila* (Kolmogorov–Smirnov, $d = 0,1126$; $p > 0,05$) como para *Elymus* ($d = 0,0950$; $p > 0,05$). Este resultado permitió hacer una regresión lineal entre la similitud y la distancia geográfica entre pares de localidades, con los datos de especies foliares presentes en más de una localidad. Con este análisis se detectó una correlación estadísticamente no significativa entre la similitud de la micobiota endofítica y la distancia entre localidades en *Ammophila* ($r^2 = 0,0496$; $p > 0,05$) (Figura 51A), y en *Elymus* ($r^2 = 0,0188$; $p > 0,05$) (Figura 51B).



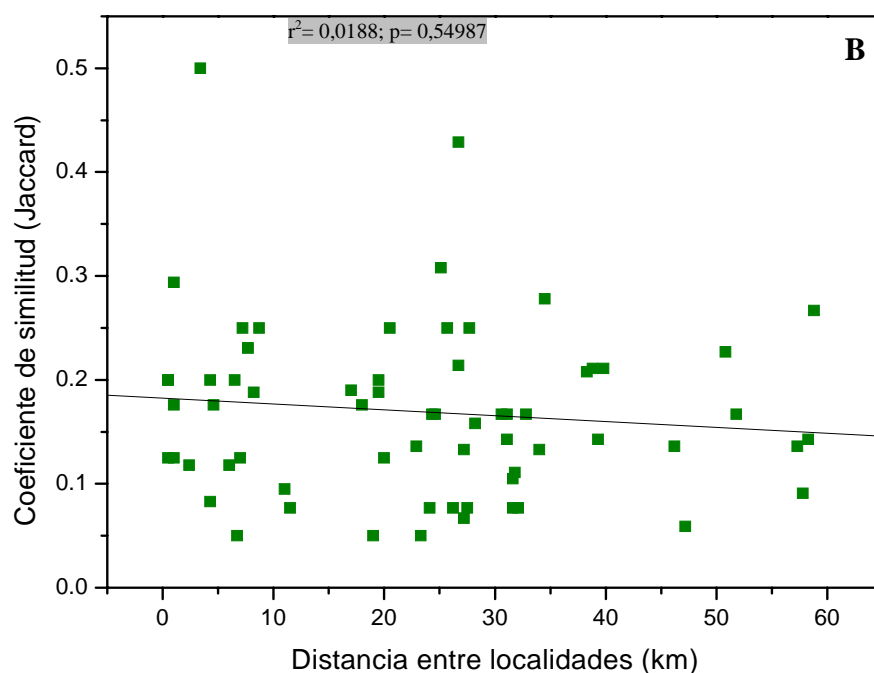


Figura 51. Relación entre la semejanza del conjunto de especies entre parejas de localidades y su distancia. El conjunto de endofitos de hojas de *Ammophila arenaria* (A) y de *Elymus farctus* (B) fue comparado en las 12 localidades. Solamente las especies presentes en más de una localidad fueron consideradas, 26 especies en *Ammophila* y 18 en *Elymus*. El coeficiente de Jaccard fue usado para estimar la similitud del conjunto de endofitos de todos los pares de localidades, y la relación entre la similitud y la distancia entre localidades fue analizada mediante regresión lineal.

4.37. Discusión.

Tanto *Ammophila* como *Elymus* poseen una gran diversidad endofíticas, 75 especies fueron aisladas de plantas de *Ammophila* (Tablas 19 y 21) y 54 de *Elymus* (Tablas 20 y 21), siendo 103 el total de especies de hongos endofíticos distintas aisladas de las dos gramíneas. Además, las curvas no asintóticas de acumulación de especies (Figura 48, curvas continuas) y la importante diferencia en la composición de especies en cada localidad indican que más especies de endofitos podrían ser identificadas si se aumentase el número de plantas y/o localidades analizadas.

Las curvas de acumulación de especies basadas únicamente en los datos de las especies plurales fueron asintóticas (Figura 48, curvas discontinuas), lo que indica que la mayoría de especies comúnmente asociadas a estas gramíneas han sido identificadas en este estudio. Este resultado también indica que la forma no asintótica de las curvas de

acumulación del total de especies se debe principalmente al subconjunto de especies únicas, que representan el 55% de las especies identificadas en cada gramínea. Por lo tanto, la mayoría de las nuevas especies que podrían identificarse como resultado de un incremento en el número de plantas analizadas, serían especies únicas.

Los estimadores del total de especies Bootstrap y Jackknife 2 (Tabla 23) indican que un mínimo de 92 a 136 especies se podrían llegar a encontrar en *Ammophila*, y de 66 a 100 especies en *Elymus*. Es muy probable que estos valores de la riqueza total de especies sean mayores, ya que pueden existir endofitos indetectables con los métodos de aislamiento utilizados, por ejemplo, podría haber biotrofos obligados, u otros hongos que no crezcan en los medios de cultivo utilizados. El uso de diferentes medios de aislamiento o técnicas de procesamiento de las muestras, como filtración de partículas, podrían producir especies diferentes o un número mayor de cultivos (Collado *et al.*, 2007). También existen métodos basados en el aislamiento de DNA de tejido de planta que permiten detectar endofitos no cultivables (Kowalchuk *et al.*, 1997; Neubert *et al.*, 2006, Gallery *et al.*, 2007).

Tanto la media del número de especies de endofitos por localidad, como el índice de diversidad de Shannon (H'), fueron significativamente mayores para *Ammophila* que para *Elymus* (Tabla 25; $p < 0,05$ en ambos casos). Apinis y Chesters (1964) obtuvieron un resultado similar en un censo de hongos saprofitos en ambos hospedadores. La diferencia en el número de especies endofíticas entre ambas gramíneas podría deberse a las características anatómicas de cada especie, mas que a que una de estas gramíneas pueda ser más susceptible a la colonización por endofitos que la otra. Las hojas de *Elymus* son menores en longitud y grosor que las de *Ammophila* y ésta última posee tallos que se desarrollan en macollas compactas, mientras que *Elymus* presenta tallos aislados. La menor superficie expuesta a inóculo aéreo en las hojas de *Elymus* podría influir en el total de endofitos de cada planta. El caso contrario sucede en los rizomas, los cuales son más largos y estrechos en *Elymus* que en *Ammophila*, y puede ser la explicación de porqué la proporción de especies de endofitos es mayor en rizomas de *Elymus* que de *Ammophila*.

El conjunto de endofitos de cada gramínea estuvo dominado por un número relativamente pequeño de especies generalistas (25%). Sin embargo, en cada gramínea, más del 50% del total de aislados obtenidos pertenecieron al 10% de las especies

identificadas, y las especies generalistas fueron las mayoritarias de este grupo (Tabla 21), además de ser las especies que tienen un mayor rango de distribución (Tabla 24). Esta situación del dominio de las especies generalistas fue también observada en otros estudios de endofitos en hospedadores simpátricos (Seena y Sridar, 2004; Gange *et al.*, 2007; White y Backhouse, 2007). Varias de estas especies generalistas y dominantes en el estudio (ej. *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp.) son endofitos ubícuos, presentes en otras gramíneas y familias de plantas (Stone *et al.*, 2004; Schulz y Boyle, 2005, Sánchez-Márquez *et al.*, 2007).

En contraste, endofitos específicos de un solo hospedador fueron difíciles de identificar porque el 87% de los taxones observados sólo en una gramínea fueron representados únicamente por uno o dos aislados; algunas excepciones fueron el ‘Ascomycete desconocido 1’ (Tabla 19) que parece ser un endofito específico de *Ammophila*, ya que fueron obtenidos 22 aislados de 5 localidades distintas y el ‘Ascomycete desconocido 12’, aislado de *Elymus* (Tabla 20, 6 aislados), también podría ser específico de esta planta.

La variación en la distribución geográfica de las especies de endofitos fue notable. Aproximadamente 2 tercios de las especies identificadas en cada gramínea fueron aisladas en una única localidad, 64% en *Ammophila* y 68,5% en *Elymus*. Cuando las especies endofíticas encontradas en más de una localidad fueron analizadas, se vio que la distancia entre localidades estaba inversamente relacionada con la similitud entre sus conjuntos de endofitos (Figura 51). Otras situaciones donde la distancia está inversamente relacionada con la similitud de la micobiota endofítica han sido descritas en otros estudios (Arnold *et al.*, 2003; Gange *et al.*, 2007). Este efecto geográfico explica, al menos en parte, porque en otros estudios de hongos aislados de fructificaciones de tallos senescentes y de hojarasca de *Ammophila* y *Elymus* en Inglaterra y Portugal (Apinis y Chesters, 1964; Dennis, 1983) se han encontrado muy pocas especies comunes con la micobiota endofítica de nuestro estudio (ej. *Chaetomium*, *Leptosphaeria* y *Lophodermium*).

La importancia de la localidad en la composición de la micobiota también se ha destacado por el hecho de que se haya observado una mayor similaridad entre la micobiota de *Ammophila* ($J=0,172$) en distintas localidades, que en *Elymus* en diferentes localidades

($J= 0,068$), o que en ambas gramíneas en la misma localidad ($Jaccard= 0,120$). Además, al comparar las micobiotas de hojas y rizomas de los 2 hospedadores se vio que las especies de endofitos tienen más preferencia por la localidad que por el hospedador colonizado y por el órgano infectado.

Las 103 especies diferentes identificadas en ambas plantas pertenecen a 58 géneros, 53 de los cuales pertenecen a la división Ascomycota. El predominio de este grupo ha sido observado en *Dactylis glomerata* (Sánchez-Márquez *et al.*, 2007), en *Holcus lanatus* y en otros estudios de endofitos y saprofitos de gramíneas (Barata, 1992; Wirsal *et al.*, 2001; Wong y Hyde, 2001; Morakotkarn *et al.*, 2006).

Sólo unos pocos géneros identificados como endofitos en este estudio contienen géneros de especies patógenas previamente descritas en *Ammophila* (*Lophodermium*, *Ustilago*, *Alternaria*) y en *Elymus* (*Cladosporium*, *Drechslera*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Leptosphaeria*, *Phaeosphaeria*) (Farr *et al.*, 1989) (Figura 52).

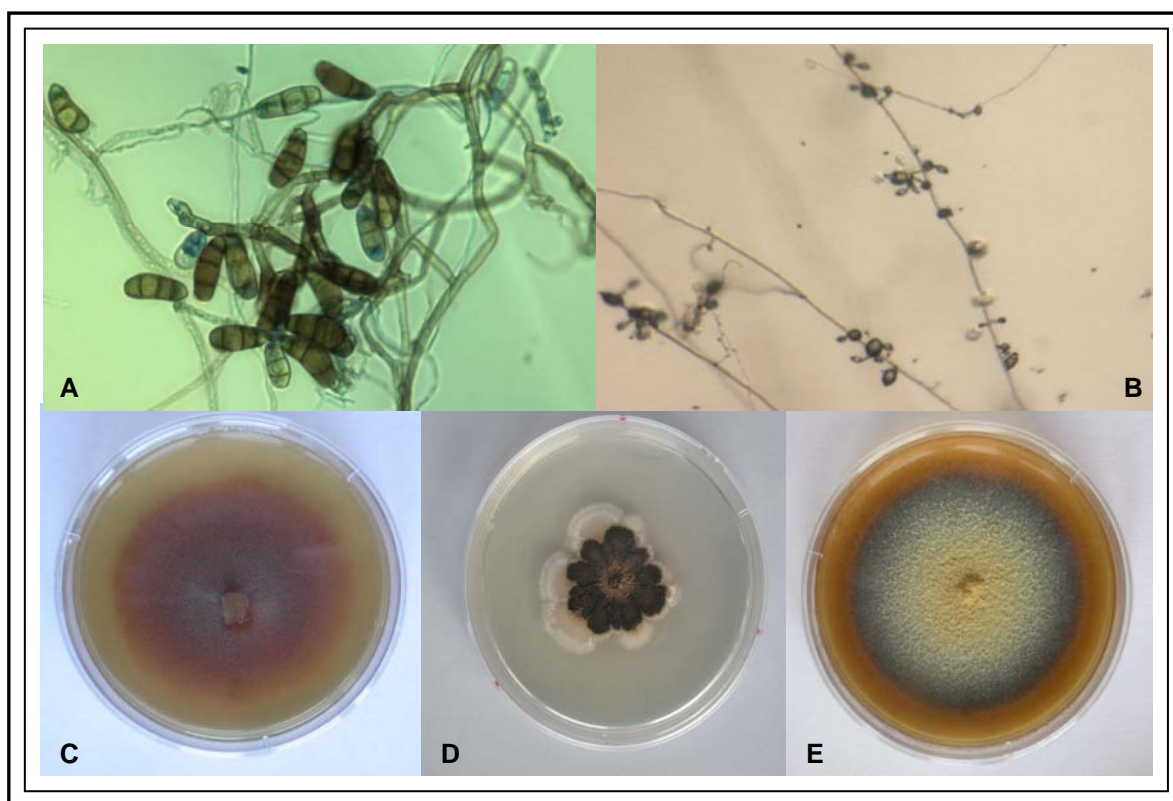


Figura 52. Fotografías a microscopía óptica y de cultivos en PDA de algunos géneros aislados de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus* y que habían sido previamente descritos como patógenos de estas gramíneas. **A.** *Curvularia*. **B.** *Gaeumannomyces*. **C.** *Lophodermium*. **D.** *Ustilago*. **E.** *Phaeosphaeria*.

Aunque los patógenos latentes se comportan como endofitos hasta la manifestación de síntomas (Mostert *et al.*, 2000; Photita *et al.*, 2004), este tipo de hongos no parecen constituir una parte importante de la microbiota endofítica de estas u otras gramíneas (Sánchez-Márquez *et al.*, 2007).

Algunas de las especies de endofitos identificadas en nuestro estudio poseen un papel ecológico importante por ser patógenos de insectos (*Cordyceps bassiana*, *Torrubiella confragosa*), patógenos de otras plantas (*Anthostomella eucalyptorum*, *Plectosphaerella cucumerina*), de animales (*Phialemonium dimorphosporum*), o por ser hongos descomponedores de madera (*Phlebia radiata*) (Figura 53).

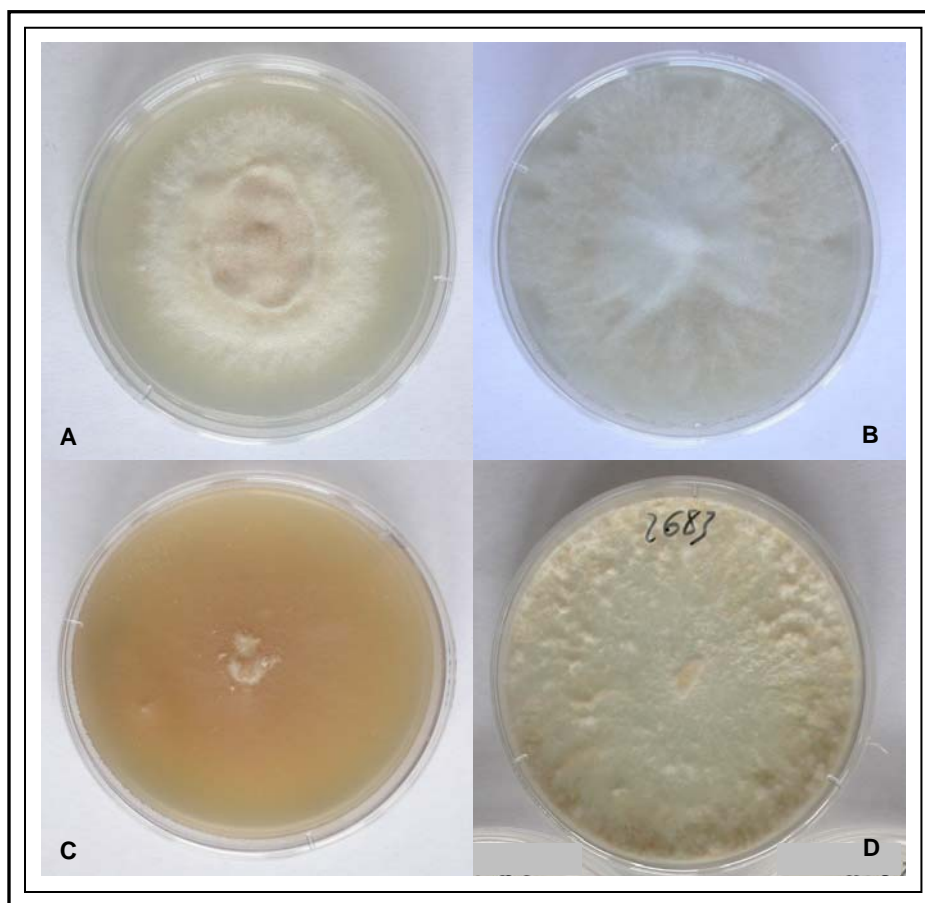


Figura 53. Algunas de las especies patógenas aisladas de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. **A.** *Cordyceps bassiana*. **B.** *Torrubiella confragosa*. **C.** *Anthostomella eucalyptorum*. **D.** *Phlebia radiata*.

Veinticuatro de los taxones aislados no pudieron ser identificados mediante técnicas moleculares, y su micelio resultó ser estéril, por lo que es posible que algunos de estos hongos sean especies hasta ahora desconocidas.

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se ha realizado un censo de la micobiota endofítica cultivable asociada a cuatro especies de gramíneas adaptadas a distintos hábitats: pastos semiáridos, suelos muy húmedos y playas. La unidad de muestreo han sido plantas individuales, en cada una de las cuales se identificó la micobiota endofítica de muestras de hojas y en algunos casos de raíces o rizomas. Se obtuvo al menos un aislado fúngico del 94,10% de las plantas, aunque esta tasa de infección podría ser mayor porque de cada planta sólo se analizó una fracción de sus hojas y raíces. Aunque la infección endofítica parece ser ubicua entre las especies de plantas, bajo determinadas condiciones medioambientales, la incidencia entre individuos puede ser menor que los altos valores observados en el presente estudio. Arnold y Lutzoni (2007), observaron un gradiente latitudinal de la infección endofítica desde los trópicos (se encontraron endofitos en el 100% de fragmentos de tejido analizados), al ártico (1% de fragmentos infectados). Por lo tanto, en ambientes inhóspitos para los hongos, o en aquellas zonas donde esté limitado el contacto con el inóculo (ej. sitios cerrados), la incidencia de los endofitos en las plantas puede ser menor.

En la composición de la micobiota endofítica de las cuatro gramíneas se han encontrado una serie de patrones comunes que se discuten a continuación.

5.1. Patrones de diversidad biológica en la micobiota endofítica de gramíneas.

La diversidad biológica de un sistema se puede explicar por medio de dos componentes: la riqueza o número de especies observadas, y la abundancia relativa de cada especie (Zak y Willig, 2004). En lo que respecta a la riqueza numérica de especies observada en este trabajo, de cuatro especies de gramíneas se obtuvieron 1455 aislados pertenecientes a 356 especies fúngicas (Tabla 29, apéndice 1). Arnold y Lutzoni (2007) clasificaron 1403 aislados obtenidos de 28 especies hospedadoras en 277 especies, lo que indica que la cantidad de especies que se ha detectado en gramíneas es notable. Es más, aunque la riqueza de especies observada es alta, las curvas de acumulación de especies indican que se trata de una infraestimación. Las curvas del total de especies en las cuatro gramíneas fueron de tipo no asintótico (Figura 54A), lo que indica que un incremento del número de plantas analizadas hubiese dado lugar a un mayor número de especies fúngicas.

Este tipo de curvas no asintóticas es un resultado frecuente en censos de especies endofíticas de hongos (Arnold *et al.*, 2000; Suryanarayanan *et al.*, 2003; Arnold y Lutzoni, 2007; White y Backhouse, 2007) y son propias de ecosistemas por un lado ricos en especies y por otro dominados por diversidad de tipo Beta.

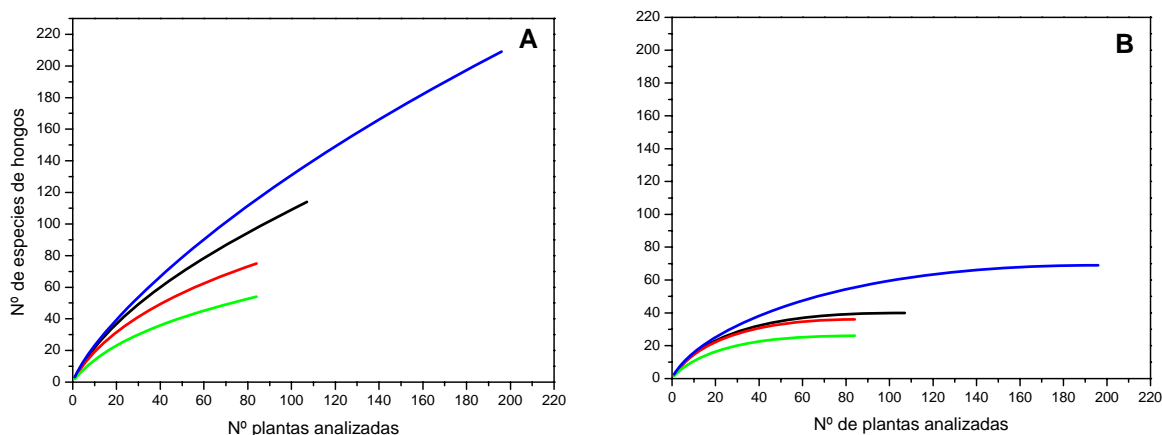


Figura 54. Curvas de acumulación de especies endofíticas elaboradas con los datos obtenidos de las 4 especies hospedadoras del estudio, *Holcus lanatus* (azul), *Dactylis glomerata* (negro), *Ammophila arenaria* (verde), *Elymus farctus* (rojo). En la figura A se muestran las curvas producidas a partir de los datos de todas las especies identificadas, y en la figura B las producidas por el subconjunto de especies plurales representadas por dos o más aislados.

Whittaker propuso que la diversidad está relacionada con la escala. El primer nivel de diversidad sería el nivel *Alfa*, que es atribuible a la diversidad que se encuentra en cada localidad o unidad de muestreo, mientras que el nivel *Beta* es atribuible a la diversidad existente entre distintas localidades o unidades de muestreo (Whittaker *et al.*, 2001; Magurran, 2004). La importancia de la diversidad *Beta* en la micobiota de endofitos de gramíneas queda reflejada en el limitado número de aislamientos por planta, una media de dos, a pesar de identificarse 356 especies de hongos. En segundo lugar, cuando se estimó la similitud de los conjuntos de especies observados en distintas localidades geográficas los valores fueron indicativos de baja similaridad entre las distintas localidades, tanto para *Holcus lanatus* como para *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus* (Tablas 16 y 26, páginas 101 y 125). En el caso de *Ammophila* y *Elymus*, así como en otros estudios, se ha observado una relación entre la diversidad *Beta* y la distancia entre unidades de muestreo (Arnold *et al.*, 2003; Gange *et al.*, 2007). Sin embargo, esta relación entre la similitud entre micobiotas y su distancia geográfica no parece existir en el caso de la micobiota de *Holcus lanatus*. Esto podría deberse a que la arena de las playas es un medio más homogéneo que los suelos donde se muestreó *Holcus*.

Tabla 29. Número de plantas y localidades analizadas, porcentaje de plantas infectadas y número de aislados y especies identificadas en cada una de las cuatro especies hospedadoras.

HOSPE- DADOR ¹	N° LOCA- LIDADES	N° PLANTAS ANALIZADAS		% PLANTAS INFECTADAS	N° AISLADOS IDENTIFICADOS			N° ESPECIES IDENTIFICADAS			DIVERSIDAD H'		
		Hojas	Raíces		Hojas (\bar{x}) ²	Raíces (\bar{x})	Total	Hojas (\bar{x})	Raíces (\bar{x})	T	Hojas	Raíces	Total
Dg	14	120	82	92,5%	228 (1,90)	83 (1,01)	311	91 (0,76)	44 (0,54)	114	4,03	3,6	4,2
HI	28	196	77	95,92%	512 (2,61)	149 (1,94)	661	157 (0,80)	79 (1,03)	208	3,93	4,05	4,27
Aa	12	84	48	91,67%	187 (2,23)	83 (1,73)	270	50 (0,60)	39 (0,81)	75	3,25	3,41	3,69
Ef	12	84	48	96,30%	124 (1,48)	89 (1,85)	213	36 (0,43)	35 (0,73)	54	2,88	3,12	3,31
TOTAL	54	484	255	-	1051	404	1455	296³	177³	356³	-	-	-
Media	-	-	-	94,10%	2,06	1,63	-	0,65	0,78	-	3,52	3,55	3,87

Nota. ¹ Hospedadores: *Dactylis glomerata* (Dg), *Holcus lanatus* (HI), *Ammophila arenaria* (Aa), *Elymus farctus* (Ef). ² La media expresa el número de aislados o especies por planta. ³ Los totales no se corresponden con la suma de las filas anteriores debido a que hay especies comunes a varios hospedadores.

En contraposición a la topología no asintótica de las curvas de acumulación de todas las especies, al considerar sólo el subconjunto de especies endofitas plurales, se obtuvieron curvas asintóticas, indicativas de saturación (Figura 54B). Estas curvas indican que en las cuatro gramíneas analizadas se ha identificado la mayoría de las especies endofíticas *comunes*, dando este nombre a las especies cuya abundancia ha sido de dos o más aislados. En segundo lugar, estas curvas asintóticas obtenidas gracias a la eliminación de las especies raras o *únicas*, aquellas de las que sólo se obtuvo un aislado, indican que la forma no asintótica típica de las curvas de acumulación de todas las especies identificadas es causada por las especies únicas.

El segundo componente de la diversidad es la abundancia relativa de cada especie. En el conjunto de gramíneas analizadas el 56,4% de las especies identificadas en hojas y el 56,5% de las de raíces pertenecieron a la categoría de especies únicas. Sobre el total, el porcentaje de especies únicas fue del 73,6% (Tabla 30). El 26,1% restante fueron especies plurales, aunque sólo de un pequeño grupo de estas especies plurales (5,3%) se obtuvieron más de 10 aislados por especie. La distribución desigual de la abundancia de aislados, con la mayoría de especies presentes en muy baja frecuencia y un reducido número de especies dominantes (Figura 55) es característica de conjuntos biológicos, incluidas otras micobiotas endofíticas (Arnold *et al.*, 2001; Suryanarayanan *et al.*, 2003; Higgins *et al.*, 2006; Arnold y Lutzoni, 2007; White y Backhouse, 2007).

Tabla 30. Número y porcentaje (entre paréntesis) de las especies únicas identificadas en cada especie hospedadora.

HOSPEDADOR	HOJAS	RAÍCES/RIZOMAS	TOTAL
<i>Dactylis glomerata</i>	58 (63,74)	25 (56,82)	74 (64,91)
<i>Holcus lanatus</i>	107 (68,15)	55 (69,62)	135 (64,90)
<i>Ammophila arenaria</i>	28 (54,90)	21 (55,26)	39 (52,00)
<i>Elymus farctus</i>	22 (61,11)	22 (62,86)	28 (51,85)
TOTAL	167 (56,42)*	100 (56,50)*	262 (73,60)*

Nota. El total de no se corresponde a la suma de las filas anteriores debido a que algunas especies únicas fueron identificadas en más de un hospedador.

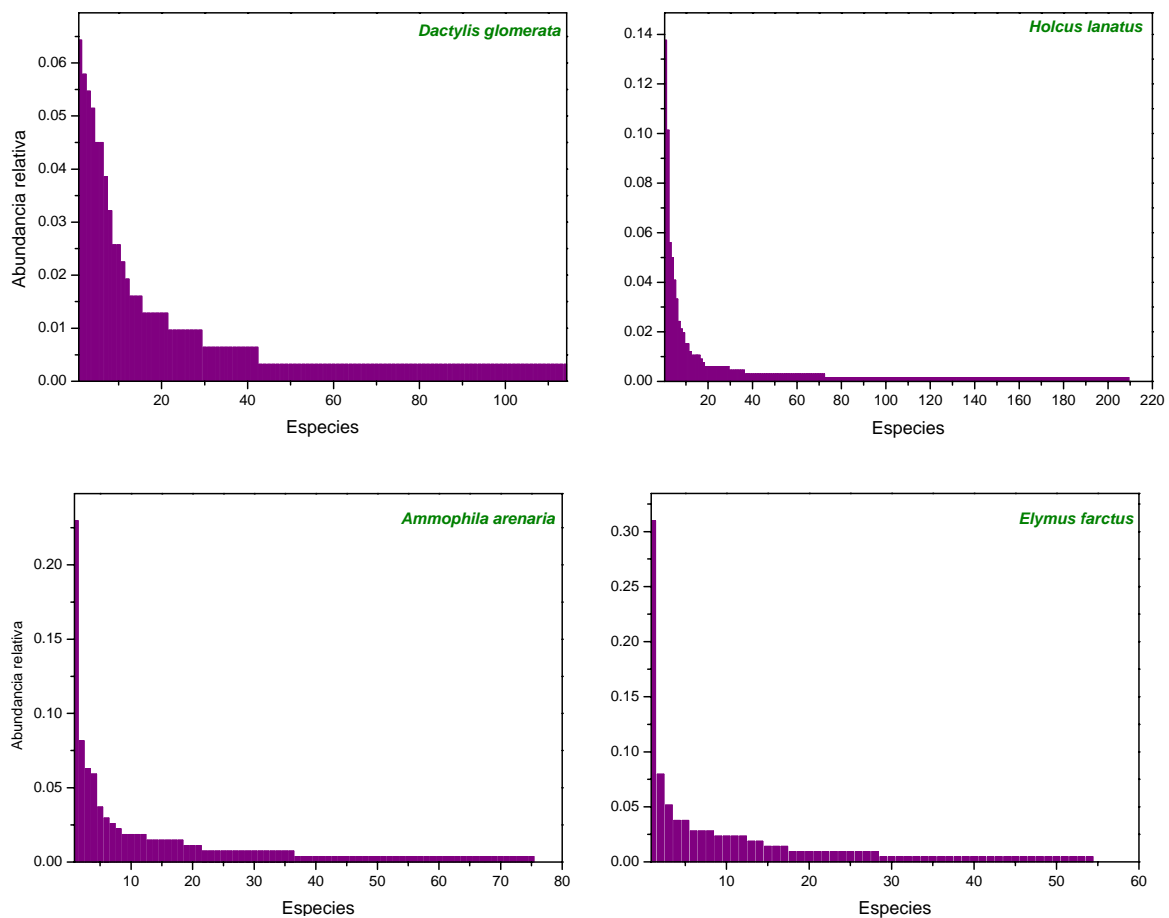


Figura 55. Ordenación de las especies de endofitos foliares según la abundancia relativa de aislados en cada una de las especies identificadas.

La gramínea en la que menos especies se observaron fue *Elymus farctus*. Esta especie es la que tiene hojas más estrechas de las cuatro estudiadas, por lo tanto a pesar de que las longitudes de los fragmentos de hoja analizados hayan sido similares en las cuatro especies, unos 5 mm, el área foliar analizada ha sido menor para *E. farctus* y este factor podría estar relacionado con que en ella se hayan observado menos especies que en las otras gramíneas. La gramínea en la que más especies se han identificado fue *Holcus lanatus*.

Algunos índices de diversidad biológica, como el índice de diversidad de Shannon (H'), contemplan la riqueza numérica de especies y la abundancia relativa de cada especie del conjunto. El índice H' tiene un valor de 0 si sólo hay una especie, y un valor máximo cuando todas la especies del conjunto están representadas por mismo número de individuos

(Zak y Willig, 2004). En la mayoría de los ecosistemas naturales H' varía entre 1 y 5, aunque excepcionalmente puede haber ecosistemas con valores mayores, como bosques tropicales (Díaz y Wilmer, 2007) o arrecifes de coral (Espinoza y Salas, 2005), o menores como algunas zonas desérticas o agroecosistemas (Becerra y Faúndez, 2001). En el presente estudio se han obtenido unos valores elevados para las 4 especies de gramíneas (4,2 para *Dactylis*, 4,28 para *Holcus*, 3,69 para *Ammophila*, y 3,31 para *Elymus*). Estos valores son parecidos a los obtenidos en otros estudios realizados sobre endofitos de gramíneas, y mayores que los observados en estudios de endofitos de otras familias de plantas (Tabla 31), probablemente por las técnicas de aislamiento e identificación utilizadas, que han permitido la identificación de aislados estériles.

Tal como sucede en comunidades de plantas y animales, algunos autores afirman que la diversidad biológica de endofitos disminuye desde los trópicos a los ecosistemas boreales (Fisher *et al.*, 1995; Bills, 1996; Arnold y Lutzoni, 2007). No obstante, la diversidad observada en este estudio de gramíneas de la zona templada es sorprendente y no indica que la diversidad endofítica en esta familia sea menor que la que se ha observado en algunas especies de los trópicos. Casualmente, las gramíneas son una familia cuya máxima diversidad de especies se da en zonas templadas (Whittaker *et al.*, 2001), lo cual sugiere que la mayor diversidad endofítica de las Poaceas podría encontrarse en la zona templada, que es donde existe una mayor variedad de hospedadores.

Tabla 31. Valores del índice de diversidad de Shannon (H') en algunos estudios realizados sobre endofitos de gramíneas y especies de otras familias de plantas.

HOSPEDADOR	FAMILIA	H'	REFERENCIA
<i>Phragmites australis</i>	<i>Poaceae</i>	0,9 - 3,8	Neubert <i>et al.</i> , 2006
<i>Bothriochloa macra</i>		3,20 - 3,40	White y Backhouse, 2007
<i>Hyparrhenia hirta</i>		3,08 - 3,33	
<i>Guarea guidonia</i>	<i>Meliaceae</i>	1,78-3,37	Gamboa y Bayman, 2001
<i>Tripterygium wilfordii</i>	<i>Celastraceae</i>	1,26-2,99	Kumar y Hyde, 2004
<i>Adhatoda zeylanica</i>	<i>Acanthaceae</i>	1,64	Raviraja, 2005
<i>Bauhinia phoenicea</i>	<i>Caesalpiniaceae</i>	1,77	
<i>Callicarpa tomentosa</i>	<i>Verbenaceae</i>	2,14	
<i>Clerodendrum serratum</i>	<i>Lamiaceae</i>	1,37	
<i>Lobelia nicotiniifoli</i>	<i>Campanulaceae</i>	1,10	
<i>Dryas integrifolia</i>	<i>Rosaceae</i>	2,69-2,99	Higgins <i>et al.</i> , 2006
<i>Huperzia selago</i>	<i>Huperziaceae</i>	2,69-2,99	
<i>Picea mariana</i>	<i>Pinaceae</i>	2,69-2,99	
<i>Pinus taeda</i>	<i>Pinaceae</i>	0,55-2,13	Arnold <i>et al.</i> , 2007
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Apocynaceae</i>	2,25- 2,90	Kharwar <i>et al.</i> , 2008

En resumen, los resultados obtenidos indican que la riqueza de especies de la micobiota endofítica de gramíneas es enorme, la distribución de la abundancia de cada especie es muy irregular, más de la mitad de las especies identificadas son únicas, mientras que un pequeño grupo de especies son muy abundantes y dominantes, en término de abundancia relativa de los aislados. Por último, la variación entre distintas unidades de muestreo y localidades (β) es un componente muy importante de la diversidad endofítica de gramíneas.

5.2. Problemas en la estimación del número total de especies endofíticas en gramíneas.

En estudios de diversidad biológica se recurre a menudo a estimadores de la riqueza total de especies para inferir cual podría ser la riqueza del sistema estudiado. Estimadores de este tipo como Chao 2, Bootstrap, ICE, Jackknife 1, y Jackknife 2, se basan en funciones dependientes del número de especies únicas y de otras especies detectadas en dos o más muestras (Figura 23, página 59) (Chazdon *et al.*, 1998; Magurran, 2004). Para que un estimador sea fiable o al menos interpretable, sus valores han de alcanzar un crecimiento asintótico que se correspondería al valor del número total de especies. Si por el contrario, los valores del estimador no se estabilizan y aumentan con el número de muestras, tal como se ha observado que sucede en la micobiota endofítica de las cuatro gramíneas estudiadas en esta tesis (ejemplo en la figura 30, página 76), Gotelli y Colwell (2001) sugieren que en estos casos el valor máximo de un estimador debe ser interpretado como un límite inferior del número total de especies. Sin embargo, un estimador puede proporcionar valores máximos muy distintos de los de otro estimador (Tabla 32), por lo tanto, cuando todos los estimadores son no asintóticos no se puede decidir cual de ellos es el más apropiado.

En lo que se refiere a estudios de diversidad de hongos, en algún caso se ha observado que un estimador es asintótico mientras que otros no lo son (Unterseher *et al.*, 2008), pero en otros casos, no se ha encontrado un estimador asintótico que pueda ser interpretable. Por lo tanto, la evidencia obtenida en esta tesis y en otros trabajos indica que en estudios de micobiota endofítica los estimadores de la riqueza total de especies no son muy útiles, ya que suelen ser no asintóticos y esto se debe principalmente a la existencia de un elevado número de especies únicas.

Tabla 32. Valores de la riqueza total de especies de las 4 gramíneas del estudio, obtenidos con seis distintos estimadores de la riqueza total de especies.

ESTIMADOR	<i>Dactylis</i>	<i>Holcus</i>	<i>Ammophila</i>	<i>Elymus</i>
ICE	304,52	581,53	134,75	94,1
Chao 2	336,98	484,61	118,07	91,35
Jackknife 1	187,31	345,3	113,54	81,67
Jackknife 2	249,23	449,39	136,18	100,32
Bootstrap	143,12	263,69	91,63	65,71
Michaelis-Menten	187,81	342,71	113,33	67,28

La discusión anterior pone de manifiesto la enorme riqueza de la micobiota endofítica de las gramíneas. Sin embargo, a pesar de que las curvas de acumulación indican que se podrían haber identificado más especies (Figura 54A), hay otro factor que contribuye a la infraestimación de la riqueza de especies: los métodos utilizados en esta tesis sólo permiten el aislamiento de hongos cultivables en unos pocos medios sintéticos. De haberse utilizado otros medios de cultivo, o métodos de detección de hongos basados en identificación de DNA fúngico aislado de muestras vegetales (Neubert *et al.*, 2006; Gallery *et al.*, 2007), se hubiesen podido identificar más especies, entre ellas biotrofos obligados.

5.3. Composición taxonómica de la micobiota endofítica.

El 90,5% de las especies identificadas pertenecieron al phylum Ascomycota y las restantes se distribuyeron entre Basidiomycota (8,5%) y Zygomycota (1%) (Tabla 33, apéndice 1). El dominio de la división Ascomycota ha sido observado en la micobiota endofítica de un amplio rango taxonómico de especies vegetales (Stone *et al.*, 2004; Duong *et al.*, 2006; Ganley y Newcombe, 2006; Morakotkarn *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2006) y por tanto este resultado apoya la idea de que la mayoría de los hongos endofíticos son Ascomycetes.

Tabla 33. Distribución de aislados, especies y géneros identificados en los 4 hospedadores a estudio, agrupados en los tres phylum del Reino Fungi de hongos al que pertenecen.

GRUPOS TAXONÓMICOS DE HONGOS	N° DE AISLADOS			N° DE ESPECIES			N° DE GÉNEROS		
	Hojas	Raíces	Total	Hojas	Raíces	Total	Hojas	Raíces	Total
<i>Phylum Ascomycota</i>	1016	396	1412	268	170	322*	89	63	109*
<i>Phylum Basidiomycota</i>	34	5	39	27	4	30*	16	3	18*
<i>Phylum Zygomycota</i>	1	3	4	1	3	4*	1	3	3*
TOTAL	1051	404	1455	296	177	356	106	69	130

Nota. *Los totales no se corresponden con la suma de las filas anteriores debido a que hay especies y géneros que han sido comunes a hojas y raíces.

Arnold (2007) observó que la mayoría de los endofitos foliares están contenidos en las clases Dothideomycetes y Sordariomycetes. En la micobiota de nuestras gramíneas ambas clases han sido las más abundantes en número de aislados y de especies (Figura 56). El 41,9% del total de aislados perteneció a la clase Dothideomycetes y el 33,26% a los Sordariomycetes, mientras que respecto al número de especies la distribución fue del 32,5% y 20,2%, respectivamente. Cinco de los siete órdenes más comunes (Pleosporales, Hypocreales, Sordariales, Diaporthales y Xylariales) pertenecen a estas clases, siendo Pleosporales e Hypocreales los órdenes más abundantes en términos de número de especies (Figura 57). En este nivel taxonómico la composición de la micobiota de gramíneas difiere de la de árboles tropicales, en los cuales se ha observado un predominio de la clase Phyllachorales, con baja representación en nuestras gramíneas (2 géneros, *Colletotrichum* y *Glomerella*, y 6 especies aisladas de 2 de los hospedadores, *Dactylis* y *Holcus*), así como de Xylariales, Sordariales y Diaporthales (Bills, 1996, Suryanarayanan *et al.*, 2002; Schulz y Boyle, 2005; Arnold y Lutzoni, 2007), los cuales si fueron más frecuentes en nuestras gramíneas: 53 aislados y 19 especies de la clase Xylariales, 120 aislados y 23 especies de la clase Sordariales, tercera clase más abundante del estudio, y 34 aislados y 17 especies de la clase Diaporthales. En *Pinus monticola* de Norteamérica predominaron los Rhytismatales, un orden minoritario en gramíneas (Ganley y Newcombe, 2006). Petrini (1986) propuso que los endofitos podrían ser específicos a nivel de familia de plantas. Las diferencias observadas entre la filiación taxonómica de los endofitos de gramíneas y los de huéspedes de otras familias podrían ser indicativas de la existencia de especialización hacia ciertos grupos de especies hospedadoras.

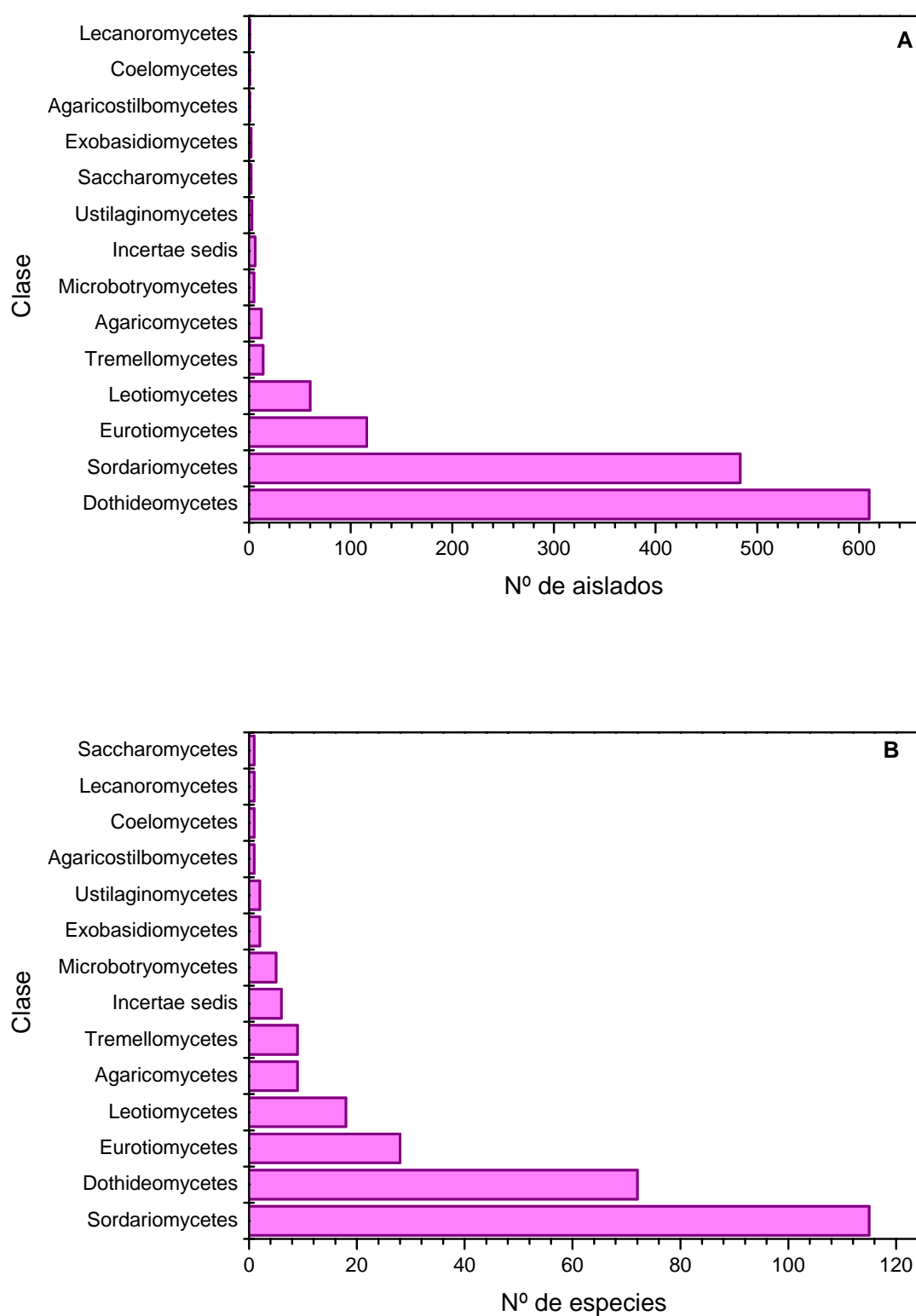


Figura 56. Composición de la microbiota de las cuatro especies de gramíneas analizadas, según el número de aislados (A) y especies (B) pertenecientes a cada clase taxonómica.

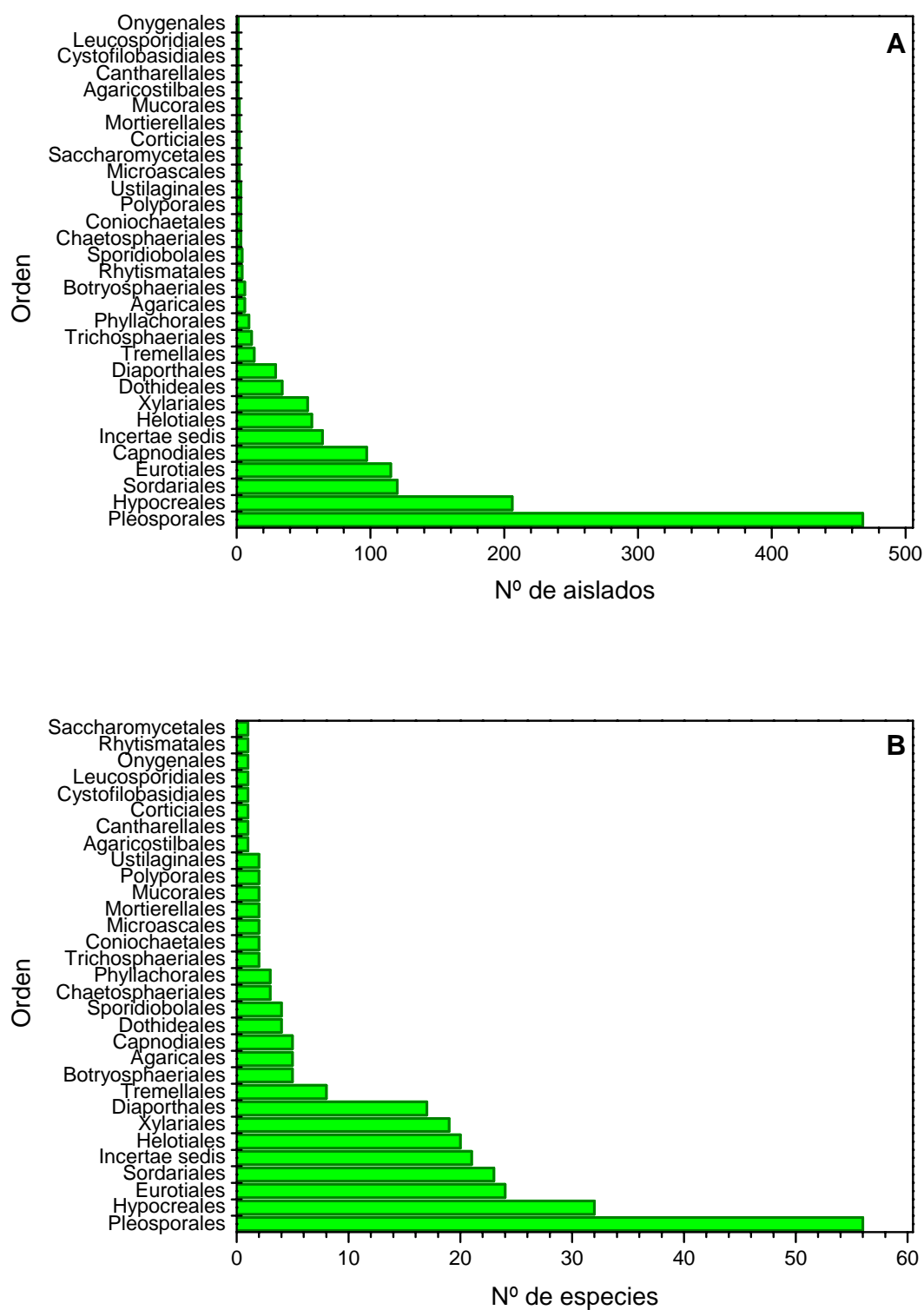


Figura 57. Composición de la microbiota de gramíneas según el número de aislados (A) y de especies (B) pertenecientes a cada orden taxonómico.

Excluyendo las 88 especies que fueron clasificadas como Ascomycete o Basidiomycete desconocido, las 278 restantes pertenecieron a 45 familias de Ascomycetes, 12 de Basidiomycetes y 3 de Zygomycetes (Apéndice 2). Las familias más destacadas en cuanto a número de especies fueron *Trichocomaceae* (24 especies), *Pleosporaceae* (16), y *Phaeosphaeriaceae* (13).

Los diez géneros más abundantes, que incluyen el 55,5% de los aislados obtenidos han sido: *Alternaria* (234 aislados), *Acremonium* (106), *Cladosporium* (100), *Penicillium* (95), *Podospora* (70), *Epicoccum* (59), *Fusarium* (42), *Chaetomium* (35), *Drechslera* (33) y *Phaeosphaeria* (33) (Figura 58). Exceptuando *Podospora*, los ocho primeros géneros son muy conocidos como endofitos de diversas especies de plantas (Bills, 1996; Stone *et al.*, 2004; Schulz y Boyle, 2005; Arnold, 2007).

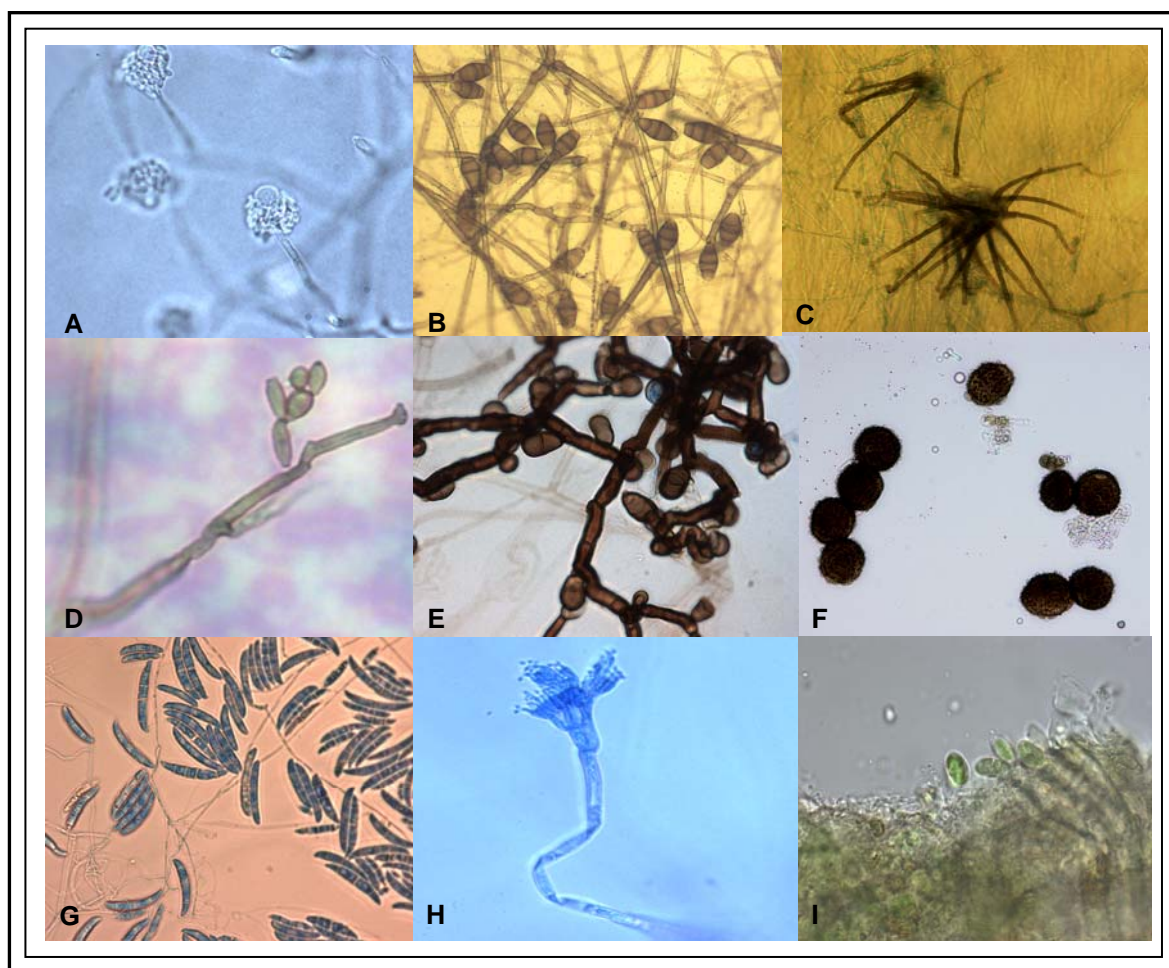


Figura 58. Fotografías a microscopía óptica de los géneros más abundantes aislados en el estudio. **A.** *Acremonium*. **B.** *Alternaria*. **C.** *Chaetomium*. **D.** *Cladosporium*. **E.** *Drechslera*. **F.** *Epicoccum*. **G.** *Fusarium*. **H.** *Penicillium*. **I.** *Phaeosphaeria*.

Un 28% de las especies no pudieron ser identificadas a nivel de género o especie al ser estériles y su secuencia no corresponderse con la de ningún taxón identificado en las bases de datos; no obstante 87 de estas especies pudieron asignarse a la división Ascomycota o Basidiomycota tras la elaboración de dendrogramas elaborados con las secuencias de las especies aisladas y otras 12 especies sólo pudieron ser asignadas a un orden o familia (Apéndice 3). Es posible que algunas de estas especies sean realmente desconocidas y además este resultado sugiere que un número elevado de especies desconocidas podrían ser descubiertas al estudiar micobiotas endofíticas. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que el potencial de nuevos descubrimientos de especies es elevado en ecosistemas endofíticos y su estudio podría contribuir a incrementar el número de especies de hongos conocidas. Se ha estimado que en la actualidad sólo se conocen cerca del 5% de los aproximadamente 1,5 millones de especies de hongos que podrían existir (Hawksworth, 2001), y los hongos endofíticos podrían representar un reservorio muy importante de especies fúngicas (Bills, 1996; Stone *et al.*, 2004).

5.4. Características de las especies únicas y dominantes.

Las especies únicas son un componente muy importante de la micobiota endofítica de gramíneas; en las cuatro especies de gramíneas analizadas un 74% de las especies de hongos fueron de este tipo. En contraste con las especies dominantes de la micobiota, las especies únicas poseen una baja tasa de transmisión. Esto podría deberse a factores como una baja producción de inóculo, una capacidad de infectar plantas en condiciones medioambientales muy particulares, una capacidad de infectar sólo a ciertos genotipos de la misma especie huésped, o una baja eficiencia infectando los huéspedes donde han sido identificadas. Algunos autores han sugerido que el genotipo del hongo podría ser importante para que una planta pueda ser infectada, de forma similar a como sucede en algunas especies de hongos fitopatógenos (Petrini, 1991; Arnold, 2007). Recíprocamente, los genotipos de la planta huésped también podrían afectar al resultado de una inoculación, Redman *et al.* (2001) observaron que un mismo aislado de *Colletotrichum magna* podía comportarse como endofito, patógeno, o ser incapaz de infectar sandía o tomate, dependiendo del cultivar de la especie huésped. En conexión con esta posibilidad, hay que

tener en cuenta que esta tesis se ha realizado con especies silvestres, en las cuales la variabilidad genética entre individuos probablemente sea notable. Es posible que algunas especies únicas identificadas en este estudio pudiesen ser más o menos exitosas si la variabilidad de su huésped fuese menor, como por ejemplo en una variedad cultivada.

Con la información disponible no es posible saber si las especies únicas son generalistas o tienden a estar especializadas en un solo huésped, para averiguarlo habría que realizar experimentos de inoculación. No obstante, de todas las especies identificadas como únicas en cada hospedador, 13 se encontraron en otros hospedadores, y por lo tanto podrían considerarse generalistas.

El 26% de las especies identificadas fueron plurales. En este conjunto, un grupo de 19 especies fueron abundantes, con más de 10 aislados y aportando el 54% de todos los aislados del estudio (Tabla 34). Estas especies podrían ser consideradas las especies *dominantes* de la micobiota de cada gramínea. A excepción de una especie, Ascomycete desconocido 1, aislada de plantas de *Ammophila arenaria*, el resto de las especies dominantes se aislaron de más de un hospedador. Esto indica que las especies endofíticas más abundantes y por lo tanto con mayor capacidad para infectar plantas también son generalistas, capaces de infectar varias especies de huéspedes. El dominio de especies generalistas en la composición de la micobiota ha sido también descrito en otros estudios sobre especies simpátricas (Seena y Sridar, 2004; Gange *et al.*, 2007; White y Backhouse, 2007).

Ocho de las especies dominantes han sido aisladas de las 4 gramíneas: *Acremonium strictum*, *Alternaria* sp., *Arthrinium* sp., *Cladosporium* sp., *Cordyceps bassiana*, *Penicillium* sp., *Phaeosphaeria* sp., y *Podospora* sp. (Figura 59; Tabla 34), por lo que podríamos considerar que estas 8 especies son endofitos comunes de gramíneas. Algunas de estas especies han sido identificadas como endofitos comunes en otras especies de plantas (Fisher y Petrini, 1992; Fisher *et al.*, 1992; Bills, 1996; Stone *et al.*, 2004; Schulz y Boyle, 2005; Neubert *et al.*, 2006; White y Backhouse, 2007). Además estas especies dominantes son ubícuas en la naturaleza, encontrándose en sustratos variados y siendo sus esporas muy comunes en el aire (De Hoog *et al.*, 2000; Pontón *et al.*, 2002).

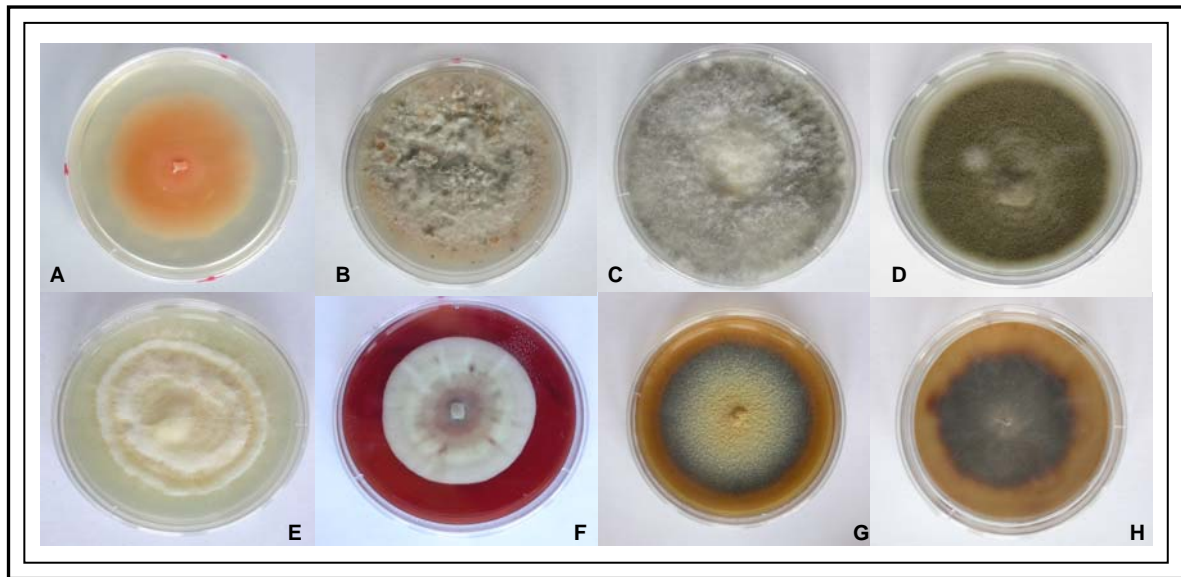


Figura 59. Cultivos en PDA de las especies comunes a los 4 hospedadores del estudio. **A.** *Acremonium strictum*. **B.** *Alternaria* sp. **C.** *Arthrinium* sp. **D.** *Cladosporium* sp. **E.** *Cordyceps bassiana*. **F.** *Penicillium* sp. **G.** *Phaeosphaeria* sp. **H.** *Podospora* sp.

Tabla 34. Especies de endofitos dominantes del estudio, con más de 10 aislados cada una, entre las que se encuentran las 8 especies comunes a los 4 hospedadores (negrita).

ESPECIE	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Holcus lanatus</i>	<i>Ammophila arenaria</i>	<i>Elymus farctus</i>	TOTAL
<i>Alternaria</i> sp.	14	62	66	91	233
<i>Cladosporium</i> sp.	20	5	1	67	93
<i>Penicillium</i> sp.	16	5	4	37	62
<i>Podospora</i> sp.	12	17	7	16	52
<i>Acremonium</i> sp.	-	16	11	22	49
<i>Epicoccum</i> sp.	14	-	-	33	47
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	2	2	27	31
<i>Acremonium strictum</i>	17	4	6	2	29
<i>Curvularia inaequalis</i>	-	4	4	14	22
Ascomycete desconocido 2847	-	22	-	-	22
<i>Arthrinium</i> sp.	1	7	-	13	21
<i>Helgardia</i> sp.	18	-	-	-	18
<i>Cordyceps bassiana</i>	3	4	8	2	17
<i>Drechslera</i> sp.	5	-	2	10	17
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	10	1	2	4	17
<i>Preussia australis</i>	-	2	14	-	16
<i>Microdochium bolleyi</i>	-	8	5	-	13
<i>Chaetomium</i> sp.	-	2	2	7	11
<i>Leptosphaeria</i> sp. B	-	3	8	-	11
TOTAL	130	164	142	345	781

En el estudio de la micobiota de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*, dos gramíneas que crecen en simpatría, el 25% de las especies fueron generalistas, encontradas en ambos hospedadores (Tabla 21, página 101). Considerando las cuatro gramíneas analizadas en este estudio la proporción de especies generalistas se mantiene, el 26% de todas las especies identificadas se aislaron en más de una especie hospedadora (Figura 60, apéndice 4). Sin embargo, no es posible estimar cuantas de las 263 especies únicas podrían infectar a más de una especie hospedadora.

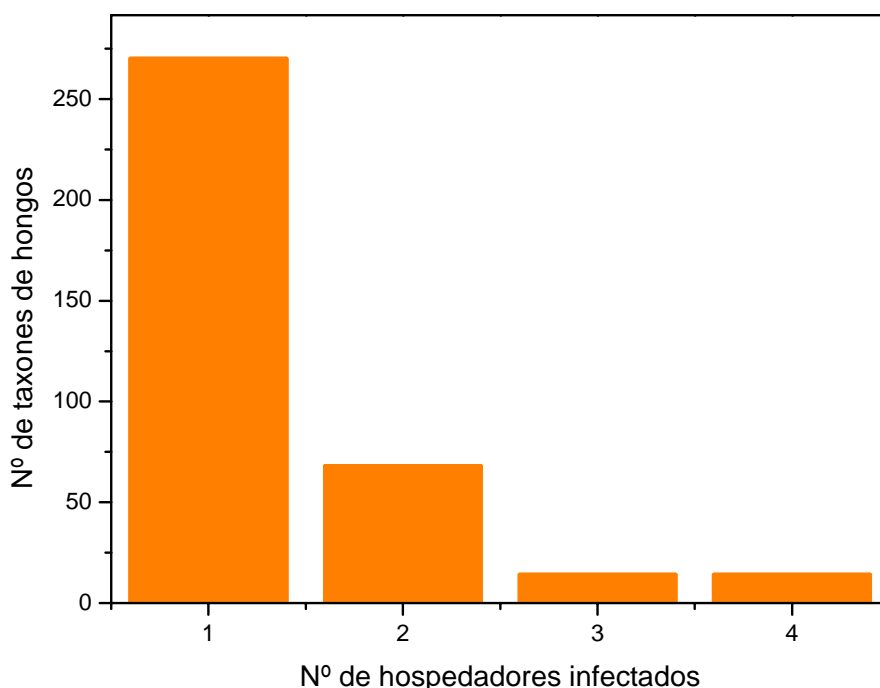


Figura 60. Distribución de las 356 especies endofíticas identificadas en las cuatro gramíneas según el número de hospedadores del que han sido aisladas.

Al estimarse la similitud entre el conjunto de especies aisladas de los cuatro huéspedes del estudio (Tabla 35), siendo mayores las diferencias entre la similitud de *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus* ($J = 0,252$), mientras que las menores medias fueron obtenidas entre *Holcus lanatus* y *Elymus farctus* ($J = 0,087$), lo que puede implicar que la influencia de la distancia geográfica es posiblemente un factor más importante en la composición de la micobiota que el nivel de preferencia de los hongos por uno u otro hospedador.

Tabla 35. Similitud estimada mediante el índice de Jaccard, de las micobiotas de las 356 especies de endofitos identificadas en el estudio y aisladas de las 4 especies de gramíneas: *Dactylis glomerata* (Dg), *Holcus lanatus* (Hl), *Ammophila arenaria* (Aa) y *Elymus farctus* (Ef).

	Dg (114)^b	Hl (208)	Aa (75)	Ef (54)
Ef	0,091 (14) ^a	0,087 (21)	0,252 (26)	
Aa	0,092 (16)	0,105 (27)		
Hl	0,122 (35)			
Dg				

Nota. ^a Número de especies en común entre ambos hospedadores. ^b Número de especies observadas.

5.5. Especificidad de órganos.

La identificación de especies endofíticas específicas de ciertos órganos de la planta se complica debido al elevado número de especies únicas. No obstante, en algunos trabajos se ha comparado la micobiota de distintos órganos y se ha observado que la tasa de colonización y la composición taxonómica de la micobiota varía entre órganos; algunas especies están presentes en varios órganos, mientras que otras están limitadas a raíces, tallos u hojas (Suryanarayanan y Vijaikrishna, 2001; Kumar y Hyde, 2004).

En las gramíneas de este estudio hay una serie de endofitos de los cuales se han obtenido más de 5 aislados en un solo tipo de órgano (Tabla 36), estos hongos podrían ser órgano-específicos. Sin embargo, algunos hongos aislados sólo de rizomas u hojas en una especie, fueron hallados en otros órganos en otra especie; este es el caso de *Acremonium* sp. B y *Microdochium* sp. en *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. También es interesante el caso de *Epichloë clarkii*, del cual se obtuvieron 3 aislados de hojas y 1 de raíces de *Holcus lanatus*; los endofitos del género *Epichloë*, que han sido relativamente bien estudiados, supuestamente sólo infectan órganos aéreos (Schardl *et al.*, 2004), pero al parecer podría haber excepciones.

Tabla 36. Especies endofíticas representadas por 5 ó más aislados y que fueron encontradas en un solo tipo de órgano.

ESPECIE	Nº AISLADOS	TEJIDO	PLANTA HUÉSPED
<i>Chaetomium globosum</i>	8	Hojas	Aa, Hl
<i>Epicoccum nigrum</i>	8	Hojas	Dg, Aa, Ef
<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	8	Raíces/rizomas	Aa, Ef, Hl
<i>Hypoxylon</i> sp.	5	Hojas	Ef
<i>Leptosphaeria</i> sp. B	11	Raíces/rizomas	Aa, Ef, Hl
<i>Microdochium phragmitis</i>	6	Hojas	Dg
<i>Nigrospora oryzae</i>	6	Hojas	Aa, Hl
<i>Periconia macrospinosa</i>	5	Raíces/rizomas	Dg, Hl
<i>Ulocladium</i> sp.	5	Hojas	Dg, Hl
Ascomycete desconocido 1 (2829)	7	Hojas	Hl

Nota. Hospedadores: *Ammophila arenaria* (Aa), *Dactylis glometata* (Dg), *Elymus farctus* (Ef) y *Holcus lanatus* (Hl).

Dentro del grupo de las especies generalistas, que han sido aisladas de los 4 huéspedes del estudio, están incluídas las especies más abundantes, y de éstas un grupo de 8 especies fueron comunes a parte aérea y subterránea de las plantas, siendo el nº de aislados de hojas en las 8 especies mayor que el de raíces (Tabla 37). Esta micobiota dominante comprende el 37% de los aislados totales de hojas, y el 11,3% de las raíces.

Tabla 37. Taxones más abundantes aislados de hojas y raíces de los 4 hospedadores del estudio. En negrita se destacan las especies comunes a ambas partes de la planta.

ESPECIES DE HOJAS	Nº AISLADOS	ESPECIES DE RAÍCES	Nº AISLADOS
<i>Alternaria</i> sp.	193	<i>Alternaria</i> sp.	40
<i>Cladosporium</i> sp.	85	<i>Penicillium</i> sp.	23
<i>Penicillium</i> sp.	39	<i>Acremonium</i> sp.	19
<i>Epicoccum</i> sp.	38	<i>Podospora</i> sp.	18
<i>Podospora</i> sp.	33	<i>Microdochium bolleyi</i>	12
<i>Acremonium</i> sp.	30	<i>Leptosphaeria</i> sp. B	11
<i>Aureobasidium pullulans</i>	29	<i>Epicoccum</i> sp.	9
<i>Acremonium strictum</i>	23	<i>Cladosporium</i> sp.	8
Ascomycete desconocido 2847	19	<i>Helgardia</i> sp.	7
<i>Arthrimum</i> sp.	18	<i>Acremonium strictum</i>	6
<i>Curvularia inaequalis</i>	16	<i>Curvularia inaequalis</i>	6
<i>Cordyceps bassiana</i>	15	<i>Drechslera</i> sp.	5
TOTAL	538	TOTAL	164

En lo que respecta a las diferencias cuantitativas entre la micobiota de los distintos órganos, la diferencia en riqueza numérica de especies entre hojas y rizomas no fue estadísticamente significativa en *Ammophila* ni en *Elymus*, ni tampoco lo fue la diferencia en número de especies entre la micobiota de hojas y de raíces de *Holcus*. Este resultado es sorprendente, pues sugiere que la diversidad de inóculo efectivo podría ser similar en el aire y bajo tierra. Es posible que aun habiendo inóculo más diverso y abundante en el aire, las condiciones para la inoculación de algunas especies sean mejores bajo tierra. Esta situación podría explicar el motivo por el cual en *Tripterygium wilfordii* se haya observado un mayor porcentaje de colonización en hojas que en raíces, pero que la diversidad de especies sea similar en ambos tejidos (Kumar y Hyde, 2004), o que se haya observado que la riqueza y abundancia de especies era mayor en raíces subterráneas que en raíces aéreas de *Ficus benghalensis* (Suryanarayanan y Vijaikrishna, 2001).

Sin embargo, los resultados del estudio de *Holcus*, *Ammophila* y *Elymus* sugieren que cualitativamente la micobiota aérea es distinta de la subterránea. En estas plantas se observó que al comparar distintas localidades, la micobiota foliar presentaba un grado de similitud mayor comparada con la subterránea. El hecho de que el inóculo dispersado por vía aérea tenga mayores posibilidades de acceder a distintas localidades que el inóculo producido bajo tierra podría explicar este resultado.

5.6. Estacionalidad.

Las plantas de este estudio fueron muestreadas a lo largo de los años 2003, 2004, 2005 y 2006, en diferentes épocas del año. En general, el número mayor de especies por planta se observó en las muestras recogidas en invierno (Figura 61, apéndice 5). Las especies aisladas en cada estación vienen reflejadas en el Apéndice 6. Es posible que esto esté relacionado con la edad de las plantas, ya que en invierno las plantas han alcanzado su máximo tiempo de exposición al inóculo, o también puede ser debido a que la expansión de endofitos previamente presentes en la planta haya llegado a su máximo. Es conocido que la incidencia de infecciones endofíticas aumenta con la edad de las plantas (Rodrigues, 1996; Arnold *et al.*, 2003). De las 356 especies de endofitos identificados, solamente 19 se

aislaron en las 4 estaciones del año (Tabla 38), encontrándose dentro de estas 19 especies las especies generalistas y 14 de las especies más abundantes del estudio.

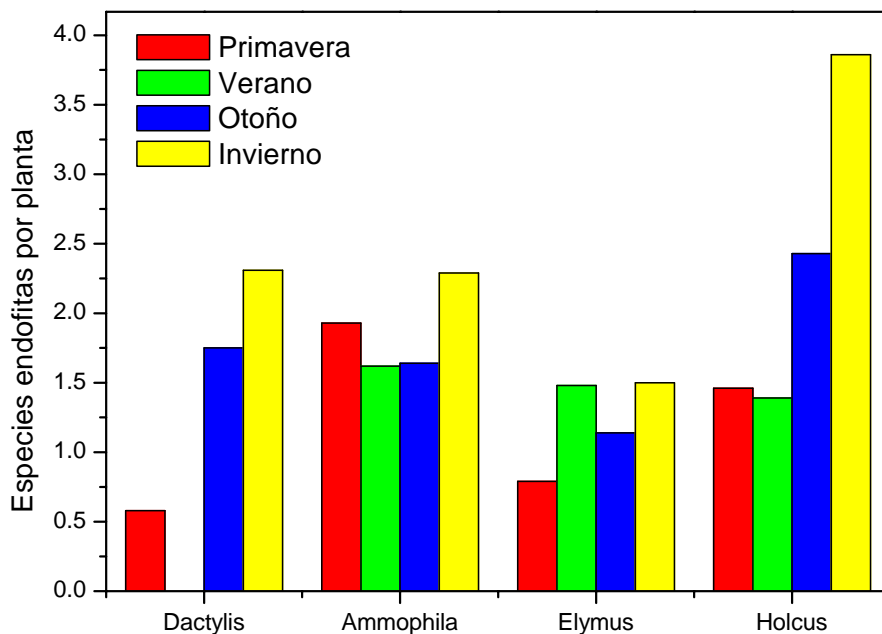


Figura 61. Número medio de especies endofíticas identificadas en cada planta según la estación del año en que se recogieron las muestras.

Tabla 38. Especies identificadas en las 4 estaciones del año.

ESPECIE	
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp.
<i>Altenaria</i> sp.	<i>Microdochium bolleyi</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Neofabraea alba</i>
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
<i>Coniothyrium cereale</i>	<i>Phaeosphaeria</i> sp.
<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>
<i>Drechslera</i> sp.	<i>Podospora</i> sp.
<i>Epicoccum</i> sp.	

5.7. Función ecológica de las especies endofíticas.

En este estudio se han aislado varias especies de endofitos conocidos como patógenos de plantas (Tabla 39), entre los que se incluyen patógenos específicos de gramíneas, patógenos potenciales de cereales, y de otros cultivos. Solamente el 4% de las especies que ya habían sido descritas previamente como patógenos de estas 4 plantas por Farr y colaboradores (1989) han sido aisladas en el presente estudio (Tabla 40), por lo que sólo un pequeño porcentaje de los endofitos parecen ser patógenos. *Drechslera*, *Fusarium* y *Phaeosphaeria* podrían ser más específicos de gramíneas, ya que han sido frecuentemente aislados como patógenos en muchas especies de gramíneas (Farr *et al.*, 1989). Otros géneros frecuentes como patógenos de gramíneas han sido poco representados (*Ustilago*, un único aislado).

Tabla 39. Especies de endofitos identificados en el estudio previamente conocidas como fitopatógenas.

ESPECIES PATÓGENAS DE PLANTAS		
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Drechslera dactylidis</i> *	<i>Macrophomina phaseolina</i> *
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Drechslera</i> sp.	<i>Microdochium bolleyi</i> *
<i>Alternaria alternata</i> *	<i>Epichloë clarkii</i> *	<i>Microdochium</i> sp.
<i>Alternaria citri</i>	<i>Epichloë typhina</i> *	<i>Nigrospora</i> sp.
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i> *	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	<i>Epicoccum</i> sp.*	<i>Periconia macrospinosa</i> *
<i>Ascochyta</i> sp.*	<i>Fusarium culmorum</i> *	<i>Phaeosphaeria avenaria</i> *
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium equiseti</i> *	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
<i>Aspergillus</i> sp.*	<i>Fusarium oxysporum</i> *	<i>Phoma terrestris</i> *
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Fusarium poae</i> *	<i>Phoma</i> sp.*
<i>Botryosphaeria dothidea</i> *	<i>Fusarium sporotrichioides</i> *	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.*	<i>Stagonospora arenaria</i> *
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> *	<i>Stagonospora</i> sp.*
<i>Cochliobolus sativus</i> *	<i>Gibberella avenacea</i> *	<i>Stemphylium</i> sp.*
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Glomerella graminicola</i> *	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Helgardia</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.
<i>Coniochaeta ligniaria</i>	<i>Laetisaria arvalis</i> *	<i>Ulocladium</i> sp.
<i>Coniothyrium cereale</i>	<i>Laetisaria</i> sp.	<i>Ustilago</i> sp.*
<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	<i>Valsa sordida</i>
<i>Curvularia inaequalis</i> *	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.
<i>Drechslera biseptata</i> *	<i>Leptosphaerulina</i> sp.	

Nota. Las especies marcadas con un asterisco (*) han sido descritas como patógenos de gramíneas (Farr *et al.*, 1989).

Tabla 40. Especies identificadas en el estudio que eran previamente conocidas como patógenos de estas gramíneas (Farr *et al.*, 1989).

HOSPEDADOR	Nº PATÓGENOS (Farr <i>et al.</i> , 1989)	ESPECIES PATÓGENAS	GÉNEROS PATÓGENOS
<i>Dactylis glomerata</i>	68	<i>Drechslera biseptata</i> <i>Drechslera dactylidis</i> <i>Drechslera</i> sp. <i>Epichloë typhina</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Stagonospora arenaria</i>	<i>Ascochyta</i> <i>Drechslera</i> <i>Epichloë</i> <i>Fusarium</i> <i>Microdochium</i> <i>Periconia</i> <i>Phaeosphaeria</i> <i>Phoma</i> <i>Stagonospora</i> <i>Ustilago</i>
<i>Holcus lanatus</i>	25	<i>Cochliobolus sativus</i> <i>Gaeumannomyces graminis</i> <i>Phoma terrestris</i>	<i>Cochliobolus</i> <i>Drechslera</i> <i>Collatotrichum</i> <i>Gaeumannomyces</i> <i>Microdochium</i> <i>Phoma</i>
<i>Ammophila</i> sp.	26	<i>Altenaria</i> sp. <i>Lophodermium</i> sp.	<i>Altenaria</i> <i>Lophodermium</i>
<i>Elymus</i> sp.	137	<i>Microdochium bolleyi</i>	<i>Acremonium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Curvularia</i> <i>Drechslera</i> <i>Leptosphaeria</i> <i>Microdochium</i> <i>Phaeosphaeria</i>

También se aislaron endofitos patógenos de insectos como *Cordyceps bassiana*, *Fusarium* sp., *Metarrhizium anisopliae*, *Paecilomyces* sp. y *Torrubiella confragosa* (= *Verticillium lecanii*) (Figura 62), que son algunas de las especies más importantes de hongos entomopatógenos (López y Hans Börje, 2001). Estos hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control de ectoparásitos, además de poseer la capacidad de sintetizar toxinas (dextruxinas, demetildestruxina y protodextruxina), importantes para la posible síntesis de productos químicos de baja toxicidad y de elevada acción insecticida, acaricida y nematocida. Por lo tanto, la utilización de hongos entomopatógenos para el control de insectos es una alternativa viable desde el punto de vista económico, además de poder realizarse programas de control de insectos con estos hongos para seleccionar razas patogénicas y virulentas adaptadas a condiciones ecológicas específicas (Zabalgogea *et al.*, 2008b). La mayoría de los hongos entomopatógenos conocidos hasta la actualidad habían sido aislados de muestras de tierra, por lo que es interesante conocer que pueden

presentar también un ciclo endofítico, pudiendo llegar a ser beneficiosos para las plantas que los albergan.

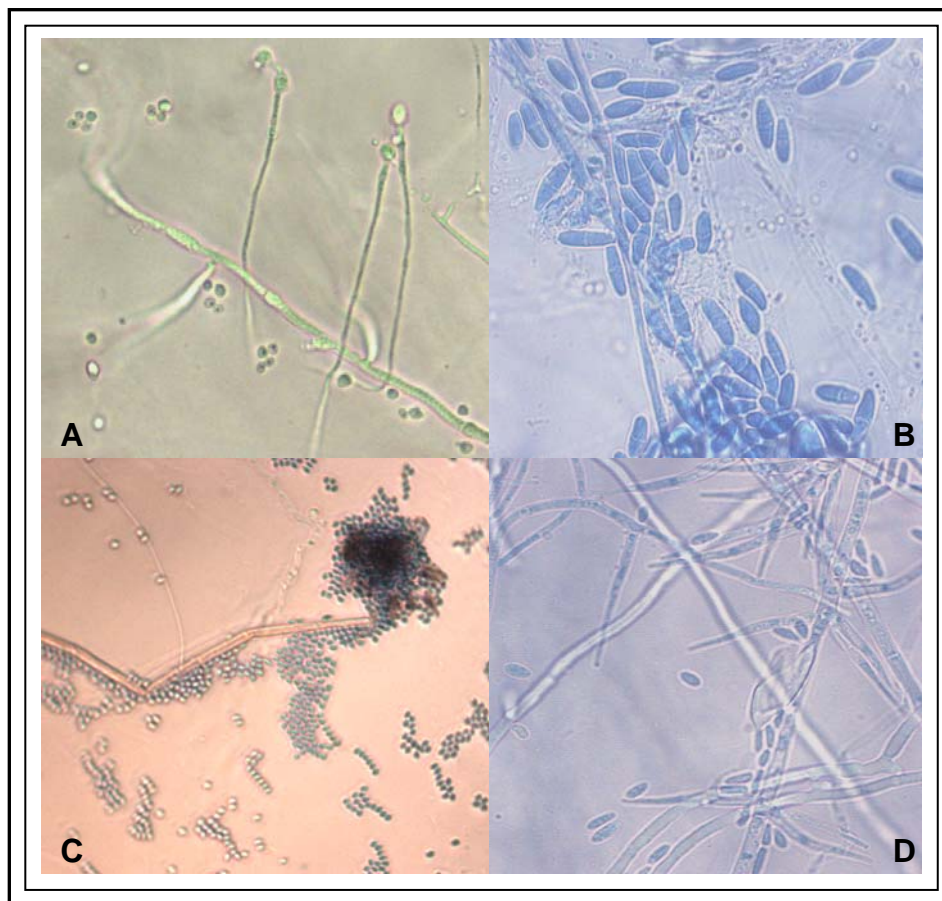


Figura 62. Fotografías a microscopía óptica de algunas de las especies de hongos entomopatógenos aisladas en el estudio. **A.** *Cordyceps bassiana*. **B.** *Fusarium* sp. **C.** *Paecilomyces* sp. **D.** *Torrubiella confragosa*.

De la mayoría de gramíneas analizadas se obtuvo un número elevado de aislados pertenecientes a géneros cosmopolitas como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, y *Penicillium*. Estos géneros son frecuentes en el ambiente, encontrándose un alto número de esporas en el aire, y causando importantes problemas de alergias (Gravesen, 1979, 1994; Miller, 1992), principalmente especies como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium culmorum*, *Leptosphaeria* sp., *Nigrospora* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum* y *Phoma* sp. (Ponton *et al.*, 2002) (Figura 63). Además, los edificios contaminados son, hoy en día, una

de las tres causas principales de enfermedades por hongos en países industrializados (Hunter *et al.*, 1988; Rowan *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000). Por lo tanto, algunos de los endofitos más comunes producen alergias, por lo que ya sabemos que estos hongos pueden ser una fuente de nuevas especies que produzcan enfermedades respiratorias.

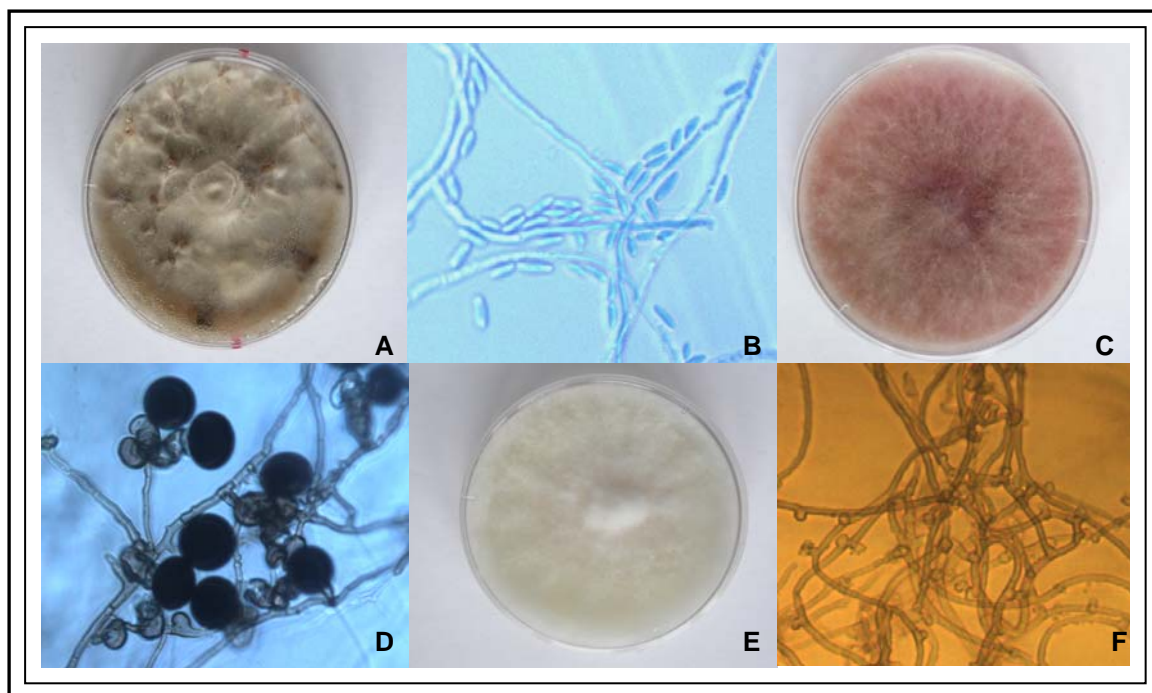


Figura 63. Fotografías a microscopía óptica y de cultivos en PDA de algunas de las especies de hongos que son frecuentes en el ambiente. **A.** *Aspergillus niger*. **B.** *Aureobasidium pullulans*. **C.** *Fusarium culmorum*. **D.** *Nigrospora* sp. **E.** *Penicillium brevicompactum*. **F.** *Phoma* sp.

Otras de las especies aisladas son importantes debido a que producen metabolitos secundarios importantes para la industria y la salud humana, ya que son productoras de enzimas (*Aspergillus niger*, *Gliomastix murorum*), o potencialmente productoras de micotoxinas (Tabla 41), y de sustancias antimicrobianas.

Además, varios géneros como *Acremonium*, *Fusarium*, y *Trichoderma*, producen tricotecenos, toxinas inhibidoras de la síntesis de proteínas en las células de mamíferos. Se han detectado cuatro tricotecenos como contaminantes naturales: toxina T-2, nivalenol, desoxinivalenol (DON), y diacetoxiscirpenol. El desoxinivalenol es el más común, pero el menos tóxico y su toxina es producida por *Fusarium culmorum*, *F. poae* y *F. sporotrichoides*, especies patógenas vegetales, como la enfermedad del brote de golpe blanco del trigo causada por *F. culmorum* (Wiese, 1987).

Tabla 41. Especies de hongos productoras de micotoxinas y compuestos antimicrobianos.

ESPECIES DE HONGOS	MICOTOXINAS PRODUCIDAS	REFERENCIAS
<i>Acremonium</i> sp.	Tricotecenos	Mantle, 1991 Moss, 1991 Smith y Henderson, 1991
<i>Alternaria citri</i>	Ácido tenuazónico, Alternariol, Gliotoxinas	Andersen <i>et al.</i> 2002 Chen <i>et al.</i> , 1997 Pitt, 1997
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilina, Fumigaclavinas, Fumitremorgina A y B, Gliotoxinas, Verruculógeno, Viriditoxina	Bullerman, 1997 Chen <i>et al.</i> , 1997 Hocking, 1997 Pitt, 1997
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido oxálico Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, Malformina, Ocratoxina A	Mantle, 1991 Moss, 1991
<i>Aspergillus terreus</i>	Citreoviridina, Citrinina, Citroviridina, Territrem B1	Smith y Henderson, 1991 Bullerman, 1997 Chen <i>et al.</i> , 1997 Doyle <i>et al.</i> , 1997 Heenan <i>et al.</i> 1998 Hocking, 1997 Pitt, 1997
<i>Aspergillus versicolor</i>	Ácido ciclopiazonico, Esterigmatocistina	Chen <i>et al.</i> , 1997 Bullerman, 1997 Hocking, 1997 Pitt, 1997
<i>Chaetomium funicola</i>	Chaetoglobinas	Mantle, 1991 Moss, 1991
<i>Chaetomium globosum</i>	Quetoglobosina	Smith y Henderson, 1991 Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>Cordyceps</i> sp.	Cordicepina	Pitt, 1997
<i>Eurotium amstelodami</i>	Esterigmatocistina	
<i>Fusarium culmorum</i>	Acetoxyscirpenediol, Acetyldeoxynivalenol, Acetylneosolaniol, Avenaceina, Beauvericina, Butenolide, Deacetylcalonectrina, Desoxinivalenol, Fructigenina, Fumonisina B1, Ipomeanina, Lateritina, Moniliformina, Monoacetato de deoxinivalenol, Monoacetoxyscirpenol, Neosolaniol, Nivalenol, Sambucinina, Scirpentriol, Toxina acetil T-2, Toxina HT-2, Toxina HT-2, Toxina NT-1, Toxina NT-2, Toxina T-1, Triacetoxyscirpendiol, Yavanicina, Zearalenona	Smith y Henderson, 1991 Chen <i>et al.</i> , 1997 Bullerman, 1997 Doyle <i>et al.</i> , 1997 Pitt, 1997 Logrieco <i>et al.</i> , 1998 Desjardins y Proctor, 2001 Leslie y Summerell, 2006
<i>Fusarium equiseti</i>	Acetoxyscirpenediol, Acetyldeoxynivalenol, Acetylneosolaniol, Avenaceina, Beauvericina, Butenolide, Deacetylcalonectrina, Diacetoxyscirpenol, Moniliformina, Monoacetoxyscirpenol, Nivalenol, Sambucinina, Scirpentriol, Toxina acetil T-2, Toxina HT-2, Toxina NT-1, Toxina NT-2, Toxina T-1, Toxina T-2, Triacetoxyscirpendiol, Yavanicina, Zearalenona	

Tabla 41. Continuación.

ESPECIES DE HONGOS	MICOTOXINAS PRODUCIDAS	REFERENCIAS
<i>Fusarium equiseti</i>	Acetoxyscirpenediol, Acetylneosolaniol, Avenaceina, Beauvericina, Butenolide, Deacetylcalonectrina, Diacetoxyscirpenol, Moniliformina, Monoacetoxyscirpenol, Nivalenol, Sambucinina, Scirpentriol, Toxina acetil T-2, Toxina HT-2, Toxina NT-1, Toxina NT-2, Toxina T-1, Toxina T-2, Triacetoxyscirpendiol, Yavanicina, Zearalenona	Smith y Henderson, 1991 Chen <i>et al.</i> , 1997 Bullerman, 1997 Doyle <i>et al.</i> , 1997 Pitt, 1997 Logrieco <i>et al.</i> , 1998 Desjardins y Proctor, 2001 Leslie y Summerell, 2006
<i>Fusarium oxysporum</i>	Acetoxyscirpenediol, Acetyldeosynivalenol, Acetylneosolaniol, Avenaceina, Beauvericina, Butenolide, Deacetylcalonectrina, Moniliformina, Monoacetoxyscirpenol, Nivalenol, Sambucinina, Scirpentriol, Toxina acetil T-2, Toxina HT-2, Toxina NT-1, Toxina NT-2, Toxina T-1, Yavanicina, Zearalenona	
<i>Fusarium poae</i>	Desoxinivalenol, Diacetoxyscirpenol, Fumonisin B1, Nivalenol, Toxina T-2, Tricotecenos	
<i>Fusarium solani</i>	Eniatinas, Neosolaniol, Sambucinina, Scirpentriol, Toxina NT-2, Toxina T-1, Toxina T-2	
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	Butenolide, Desoxinivalenol, Diacetoxyscirpenol, Moniliformina, Neosolaniol, Nivalenol, Territrems, Toxina T-2, Tricotecenos, Zearalenona	
<i>Fusarium subglutinans</i>	Bovericina, Fusaproliferina, Moniliformina	
<i>Fusarium verticilloides</i>	Fumonisin	
<i>Fusarium</i> sp.	Tricotecenos	
<i>Gliomastix murorum</i>	Tricotecenos	Mantle, 1991 Moss, 1991
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Eslaframina	Smith y Henderson, 1991 Chen <i>et al.</i> , 1997 Pitt, 1997
<i>Myrothecium</i> sp.	Tricotecenos	
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Ácido micofenólico	Bullerman, 1997 Chen <i>et al.</i> , 1997 Pitt, 1997
<i>Penicillium canescens</i>	Griseofulvina, Penitrem A	
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina, Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2	
<i>Penicillium thomii</i>	Ácido penicílico	
<i>Penicillium virgatum</i>	Gliotoxinas	
<i>Phoma herbarum</i>	Citocalasinas	Mantle, 1991 Moss, 1991
<i>Phoma exigua</i>	Ácido tenuazónico	Smith y Henderson, 1991
<i>Trichoderma viride</i>	Satratoxinas F, G, y H; Tricodermina	Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>Trichoderma</i> sp.	Tricotecenos	Pitt, 1997

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el número de especies fúngicas asociadas a gramíneas es muy elevado. En vista de la importancia que tienen algunas de estas especies para el hombre, debido a sus características y a las actividades que desempeñan, el estudio de los hongos asociados a gramíneas silvestres representa una fuente de recursos para la búsqueda de posibles agentes de control biológico de patógenos y plagas de plantas, o de productos farmacológicos como sustancias antimicrobianas.

CONCLUSIONES

1. La infección por hongos endofíticos es un hecho extremadamente común en gramíneas. En este estudio, más del 90% de las plantas analizadas estaban infectadas por endofitos. Esta ubicuidad sugiere que se trata de una asociación ecológica y evolutivamente estable.
2. La micobiota endofítica de las gramíneas estudiadas se caracteriza por una enorme diversidad de especies. En este trabajo se identificaron 356 especies de hongos, aisladas de 4 especies de gramíneas adaptadas a distintos hábitats.
3. El 24% de las especies aisladas no han podido ser identificadas por métodos morfológicos ni moleculares, no pudiendo ser incluidos en ninguna de las especies de hongos descritas hasta la fecha. Estos resultados sugieren que estos aislados pueden constituir nuevas especies de hongos.
4. La micobiota endofítica de cada gramínea analizada se caracteriza por la desigualdad en la riqueza de aislados de cada especie, con la mayoría de especies representadas por uno o pocos aislados, y un reducido número de especies dominantes, con más de 10 aislados. La mayoría de las especies dominantes son generalistas, capaces de infectar a más de un hospedador, y a más de un órgano de la planta.
5. A pesar de la enorme diversidad de especies detectada, las curvas de acumulación de especies no asintóticas indican que un incremento del número de plantas o localidades analizadas, llevaría a la identificación de más especies endofíticas. Sin embargo, las curvas de acumulación de las especies plurales, indican que la mayoría de especies endofíticas que comúnmente infectan a estas gramíneas, han sido aisladas e identificadas en el estudio.
6. La diferencia en la composición de la micobiota de distintas plantas o localidades, es un factor de primer orden para explicar la diversidad biológica de la micobiota endofítica.
7. La identificación molecular de aislados mediante la secuenciación parcial de una única cadena del replicón obtenido de la región ITS1-5.8S rRNA-ITS2, es tan fiable para la

identificación como la secuencia completa, por lo que podemos afirmar que es un método satisfactorio para trabajos en los cuales se analice un gran número de aislados.

8. No se han observado diferencias numéricas entre hojas y raíces en la micobiota endofítica de *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* o *Elymus farctus*, pero sí se han encontrado diferencias cualitativas en la composición de especies de cada órgano, según la distancia entre las localidades en que fueron recogidas las plantas. Esto implica que las diferencias en la micobiota pueden corresponderse a la localidad donde crecen las plantas, debido probablemente a la ausencia o presencia de los hongos en un lugar determinado.
9. Únicamente el 4% de las especies identificadas como endofitos en este estudio son especies patógenas previamente descritas en estas 4 gramíneas, lo que implica que los patógenos latentes sólo representan una pequeña fracción de la micobiota endofítica.
10. Varios géneros de potenciales patógenos de cultivos de cereales fueron aislados de plantas asintomáticas de *Dactylis glomerata* y *Holcus lanatus*, por lo que éstos podrían actuar como hospedadores alternativos y reservorios de patógenos potenciales de cultivos.
11. La revisión global de este trabajo y el estudio de sus aislados sugiere que un número significativo de estos hongos endofíticos puede desempeñar múltiples roles ecológicos, desde patógenos débiles o latentes, saprofitos latentes, patógenos de insectos y de otros animales, o descomponedores de madera, hasta hongos productores de micotoxinas y de sustancias antimicrobianas, pudiendo ser los endofitos desconocidos una importante fuente de nuevos compuestos antimicrobianos, por lo que la transcendencia ecológica de este grupo de organismos es notable.
12. Este estudio ha permitido ampliar el conocimiento sobre las especies de hongos que pueden actuar como endofitos en plantas, y sus posibles implicaciones ecológicas, creando un recurso inestimable para futuros trabajos en comparaciones evolutivas, estudios genómicos, análisis de los mecanismos de virulencia y otras áreas relacionadas con la investigación de hongos endofíticos.

APÉNDICE

Apéndice 1. Especies identificadas en el estudio, agrupadas en función del grupo taxonómico del reino Fungi al que pertenecen.

ASCOMYCETES		
<i>Acremonium alternatum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Engyodontium album</i>
<i>Acremonium cyanophagus</i>	<i>Cladosporium oxysporum</i>	<i>Epichloë clarkii</i>
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Epichloë typhina</i>
<i>Acremonium sp. A</i>	<i>Cochliobolus sativus</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<i>Acremonium sp. B</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Epicoccum sp.</i>
<i>Acremonium sp. C</i>	<i>Cochliobolus sativus</i>	<i>Eupenicillium sp.</i>
<i>Acremonium sp. D</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Eupenicillium tropicum</i>
<i>Acremonium sp. E</i>	<i>Colletotrichum trichellum</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>
<i>Acremonium sp.</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Eutypella cerviculata</i>
<i>Alternaria citri</i>	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	<i>Coniothyrium cereale</i>	<i>Fusarium equiseti</i>
<i>Arthrinium sp. A</i>	<i>Cordyceps bassiana</i>	<i>Fusarium poae</i>
<i>Arthrinium sp. B</i>	<i>Cordyceps sinensis</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Arthrinium sp.</i>	<i>Creosphaeria sassafras</i>	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
<i>Ascochyta sp.</i>	<i>Cryptodiaporthe salicella</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cryptosporiopsis sp.</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Fusarium sp. A</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Cyathicula sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>
<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Cylindrotrichum sp.</i>	<i>Gabarnaudia sp.</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Dactylaria sp.</i>	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Davidiella tassiana</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
<i>Auxarthron conjugatum</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Gibberella avenacea</i>
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	<i>Diaporthe melonis</i>	<i>Glarea sp.</i>
<i>Botryosphaeria australis</i>	<i>Diaporthe viticola</i>	<i>Gliomastix murorum</i>
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Didymella bryoniae</i>	<i>Glomerella graminicola</i>
<i>Calycina herbarum</i>	<i>Discostroma sp.</i>	<i>Glomerella lagenaria</i>
<i>Chaetomium funicola</i>	<i>Discula quercina</i>	<i>Glomerella sp.</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Drechslera andersenii</i>	<i>Gnomonia petiolorum</i>
<i>Chaetomium sp. A</i>	<i>Drechslera biseptata</i>	<i>Guignardia philoprina</i>
<i>Chaetomium sp. B</i>	<i>Drechslera dactylidis</i>	<i>Helgardia anguioides</i>
<i>Chaetomium sp. C</i>	<i>Drechslera erythrospila</i>	<i>Helgardia sp.</i>
<i>Chaetomium sp. D</i>	<i>Drechslera sp. A</i>	<i>Helicosporium pallidum</i>
<i>Chaetomium sp. E</i>	<i>Drechslera sp. B</i>	<i>Hormonema sp.</i>
<i>Chaetomium sp.</i>	<i>Drechslera sp.</i>	<i>Hypoxylon fuscum</i>
<i>Chaetosphaeria sp.</i>	<i>Embellisia sp.</i>	<i>Hypoxylon sp.</i>
<i>Chloridium sp.</i>	<i>Emericellopsis sp.</i>	<i>Kabatiella sp.</i>

Apéndice 1. Continuación.

ASCOMYCETES		
<i>Lachnum pygmaeum</i>	<i>Periconiella</i> sp.	<i>Preussia isomera</i>
<i>Lachnum</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp. A	<i>Preussia minima</i>
<i>Leptodontidium orchidicola</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp. B	<i>Preussia</i> sp.
<i>Leptodontidium</i> sp.	<i>Petriella guttulata</i>	<i>Pseudeurotium bakeri</i>
<i>Leptosphaeria microscopica</i>	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	<i>Pyrenochaeta</i> sp.
<i>Leptosphaeria</i> sp. A	<i>Phaeosphaeria luctuosa</i>	<i>Sagenomella</i> sp.
<i>Leptosphaeria</i> sp. B	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	<i>Sarea</i> sp.
<i>Leptosphaeria</i> sp. C	<i>Phaeosphaeria</i> sp. A	<i>Schizothecium</i> sp.
<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp. B	<i>Sordaria macrospora</i>
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	<i>Phaeosphaeria</i> sp. C	<i>Sordaria fimicola</i>
<i>Lophiostoma</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp. D	<i>Sporormia subticinensis</i>
<i>Lophodermium</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp. E	<i>Stagonospora arenaria</i>
<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Stagonospora</i> sp. A
<i>Microdochium bolleyi</i>	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	<i>Stagonospora</i> sp. B
<i>Microdochium nivale</i>	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	<i>Stagonospora</i> sp.
<i>Microdochium phragmitis</i>	<i>Phialocephala scopiformis</i>	<i>Stemphylium solani</i>
<i>Microdochium</i> sp.	<i>Phialocephala</i> sp.	<i>Sydowia polyspora</i>
<i>Minimidochium</i> sp.	<i>Phialophora alba</i>	<i>Thielavia</i> sp.
<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Phialophora</i> sp. A	<i>Torrubiella confragosa</i>
<i>Mycoarthritis corallinus</i>	<i>Phialophora</i> sp. B	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>
<i>Neofabraea alba</i>	<i>Phoma exigua</i>	<i>Trichocladium opacum</i>
<i>Nigrospora oryzae</i>	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Trichocladium</i> sp.
<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Phoma pinodella</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Oidiodendron</i> sp.	<i>Phoma terrestris</i>	<i>Ulocladium</i> sp.
<i>Paecilomyces carneus</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>Valsa fabianae</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Phomopsis amygdali</i>	<i>Valsa sordida</i>
<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Phomopsis columnaris</i>	<i>Valsa</i> sp.
<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Phomopsis</i> sp. A	<i>Verticillium nigrescens</i>
<i>Penicillium canescens</i>	<i>Phomopsis</i> sp. B	<i>Verticillium</i> sp.
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Phomopsis</i> sp. C	<i>Volutella ciliata</i>
<i>Penicillium thomii</i>	<i>Phomopsis</i> sp. D	<i>Xylaria</i> sp. A
<i>Penicillium virgatum</i>	<i>Phomopsis</i> sp. E	<i>Xylaria</i> sp. B
<i>Penicillium</i> sp. A	<i>Phomopsis</i> sp. F	<i>Xylaria</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp. B	<i>Phyllosticta pyrolae</i>	Coelomycete sin identificar
<i>Penicillium</i> sp. C	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Helotiales sin identificar A
<i>Penicillium</i> sp. D	<i>Pleurophoma cava</i>	Helotiales sin identificar B
<i>Penicillium</i> sp. E	<i>Podospora tetraspora</i>	Pleosporales sin identificar A
<i>Penicillium</i> sp. F	<i>Podospora coprophila</i>	Pleosporales sin identificar B
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Podospora decipiens</i>	Pleosporales sin identificar C
<i>Penicillium</i> sp. F	<i>Podospora tetraspora</i>	Pleosporales sin identificar D
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Podospora</i> sp. A	Sordariales sin identificar
<i>Periconia macrospinoso</i>	<i>Podospora</i> sp.	Xylariales sp. A

Apéndice 1. Continuación.

ASCOMYCETES		
Xylariales sp. B	Ascomycete desconocido 3070	Ascomycete desconocido 3583
Xylariaceae sin identificar	Ascomycete desconocido 3071	Ascomycete desconocido 3679
Ascomycete desconocido 179	Ascomycete desconocido 2702	Ascomycete desconocido 3704
Ascomycete desconocido 743	Ascomycete desconocido 2707	Ascomycete desconocido 3809
Ascomycete desconocido 1353	Ascomycete desconocido 2859	Ascomycete desconocido 3844
Ascomycete desconocido 1408	Ascomycete desconocido 4052	Ascomycete desconocido 3972
Ascomycete desconocido 1437	Ascomycete desconocido 2839	Ascomycete desconocido 3211
Ascomycete desconocido 1438	Ascomycete desconocido 3706	Ascomycete desconocido 3236
Ascomycete desconocido 1459	Ascomycete desconocido 2113	Ascomycete desconocido 3284
Ascomycete desconocido 1476	Ascomycete desconocido 2116	Ascomycete desconocido 3363
Ascomycete desconocido 1489	Ascomycete desconocido 2128	Ascomycete desconocido 3364
Ascomycete desconocido 1495	Ascomycete desconocido 2190	Ascomycete desconocido 3423
Ascomycete desconocido 1519	Ascomycete desconocido 2194	Ascomycete desconocido 3434
Ascomycete desconocido 1583	Ascomycete desconocido 2401	Ascomycete desconocido 3461
Ascomycete desconocido 1797	Ascomycete desconocido 2429	Ascomycete desconocido 3487
Ascomycete desconocido 1813	Ascomycete desconocido 2812	Ascomycete desconocido 3541
Ascomycete desconocido 1833	Ascomycete desconocido 2816	Ascomycete desconocido 3789
Ascomycete desconocido 1841	Ascomycete desconocido 2829	Ascomycete desconocido 3804
Ascomycete desconocido 1859	Ascomycete desconocido 3208	Ascomycete desconocido 3817
Ascomycete desconocido 1932	Ascomycete desconocido 3251	Ascomycete desconocido 3847
Ascomycete desconocido 2348	Ascomycete desconocido 3259	Ascomycete desconocido 3855
Ascomycete desconocido 1932	Ascomycete desconocido 3267	Ascomycete desconocido 3857
Ascomycete desconocido 2348	Ascomycete desconocido 3327	Ascomycete desconocido 3874
Ascomycete desconocido 2680	Ascomycete desconocido 3338	Ascomycete desconocido 3891
Ascomycete desconocido 2684	Ascomycete desconocido 3351	Ascomycete desconocido 3894
Ascomycete desconocido 2770	Ascomycete desconocido 3403	Ascomycete desconocido 3936
Ascomycete desconocido 2847	Ascomycete desconocido 3412	Ascomycete desconocido 3966
Ascomycete desconocido 2939	Ascomycete desconocido 3492	Ascomycete desconocido 3967
Ascomycete desconocido 2991	Ascomycete desconocido 3538	
Ascomycete desconocido 3062	Ascomycete desconocido 3542	

Apéndice 1. Continuación.

BASIDIOMYCETES		ZYGOMYCETES
<i>Agrocybe pediades</i>	<i>Laetisaria arvalis</i>	<i>Cunninghamella elegans</i>
<i>Ceratobasidium</i> sp.	<i>Mastigobasidium intermedium</i>	<i>Mortierella alpina</i>
<i>Coprinellus disseminatus</i>	<i>Meira</i> sp.	<i>Mortierella</i> sp.
<i>Coprinellus radians</i>	<i>Mycena</i> sp.	<i>Mucor hiemalis</i>
<i>Coprinus micaceus</i>	<i>Phlebia radiata</i>	
<i>Cryptococcus paraflavus</i>	<i>Pseudozyma aphidis</i>	
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Rhodotorula bacarum</i>	
<i>Cryptococcus victoriae</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	
<i>Cryptococcus</i> sp. A	<i>Rhodotorula minuta</i>	
<i>Cryptococcus</i> sp. B	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	
<i>Cryptococcus</i> sp. C	<i>Tilletiopsis pallescens</i>	
<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Trametes versicolor</i>	
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	<i>Ustilago</i> sp.	
<i>Dioszegia hungarica</i>	Basidiomycete desconocido 1629	
<i>Kondoa aerea</i>	Basidiomycete desconocido 2696	

Apéndice 2. Distribución taxonómica de las especies identificadas en las 4 gramíneas estudiadas.

PHYLUM/CLASE	ÓRDEN/FAMILIA	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES
ASCOMYCOTA			
Coelomycetes	Sin identificar	1	1
Dothideomycetes	Botryosphaeriales		
	<i>Botryosphaeriaceae</i>	4	5
	Capnodiales		
	<i>Davidiellaceae</i>	2	4
	<i>Mycosphaerellaceae</i>	1	1
	Dothideales		
	<i>Dothioraceae</i>	4	4
	Pleosporales		
	<i>Leptosphaeriaceae</i>	2	6
	<i>Lophiostomataceae</i>	1	1
	<i>Phaeosphaeriaceae</i>	2	13
	<i>Pleosporaceae</i>	8	16
	<i>Sporormiaceae</i>	2	5
	<i>Tubeufiaceae</i>	1	1
	Incertae sedis	6	10
	Sin identificar	?	4
	Incertae sedis		
	<i>Myxotrichaceae</i>	1	1
	<i>Pseudeurotiaceae</i>	1	1
Eurotiomycetes	Chaetothyriales		
	<i>Herpotrichiellaceae</i>	1	3
	Eurotiales		
	<i>Trichocomaceae</i>	6	24
	Onygenales		
	<i>Onygenaceae</i>	1	1
Lecanoromycetes	Incertae sedis		
	Incertae sedis	1	1
Leotiomycetes	Helotiales		
	<i>Dermataceae</i>	2	2
	<i>Helotiaceae</i>	1	1
	<i>Hyaloscyphaceae</i>	3	4
	<i>Vibrisseaceae</i>	1	2
	Incertae sedis	4	6
	Sin identificar		2
	Rhytismatales		
	<i>Rhytismataceae</i>	1	1
Saccharomycetes	Saccharomycetales		
	Incertae sedis	1	1
Sordariomycetes	Chaetosphaeriales		
	<i>Chaetosphaeriaceae</i>	3	3
	Coniochaetales		
	<i>Coniochaetaceae</i>	1	2
	Diaporthales		
	<i>Diaporthaceae</i>	2	10

Apéndice 2. Continuación.

PHYLUM/CLASE	ÓRDEN/FAMILIA	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES
ASCOMYCOTA	<i>Gnomoniaceae</i>	3	3
	<i>Togniniaceae</i>	1	1
	<i>Valsaceae</i>	1	3
	Hypocreales		
	<i>Clavicipitaceae</i>	1	2
	<i>Cordycipitaceae</i>	3	4
	<i>Hypocreaceae</i>	1	1
	<i>Nectriaceae</i>	3	12
	<i>Ophyocordicipitaceae</i>	1	1
	Incertae sedis	4	12
	Microascales		
	<i>Ceratocystidaceae</i>	1	1
	<i>Microascaceae</i>	1	1
	Sordariales		
	<i>Cephalothecaceae</i>	1	1
	<i>Chaetomiaceae</i>	3	11
	<i>Lasiophaeriaceae</i>	3	8
	<i>Sordariaceae</i>	1	2
	Sin identificar	6	1
	Trichosphaeriales		
	Incertae sedis	1	2
	Xylariales		
	<i>Amphisphaeriaceae</i>	2	3
	<i>Diatrypaceae</i>	1	1
	<i>Xylariaceae</i>	5	8
	Incertae sedis	1	4
	Sin identificar	0	3
	Incertae sedis		
	<i>Apiosporaceae</i>	1	3
	<i>Glomerellaceae</i>	2	6
	<i>Magnaporthaceae</i>	1	2
	<i>Plectosphaerellaceae</i>	2	3
Incertae sedis	Incertae sedis		
Desconocidos	Incertae sedis	2	2
		?	85
BASIDIOMYCOTA Agaricomycetes	Agaricales		
	<i>Agaricaceae</i>	1	1
	<i>Mycenaceae</i>	1	1
	<i>Psathyrellaceae</i>	1	2
	<i>Strophariaceae</i>	1	1
	Cantharellales		
	<i>Ceratobasidiaceae</i>	1	1
	Corticiales		
	<i>Corticaceae</i>	1	1
	Polyporales		
	<i>Meruliaceae</i>	1	1

Apéndice 2. Continuación.

PHYLUM/CLASE	ÓRDEN/FAMILIA	Nº GÉNEROS	Nº ESPECIES
BASIDIOMYCOTA			
	<i>Polyporaceae</i>	1	1
Agaricostilbomycetes	Agaricostilbales		
	<i>Kondoaceae</i>	1	1
Exobasidiomycetes	Incertae sedis		
	Incertae sedis	2	2
Microbotryomycetes	Leucosporidiales		
	Incertae sedis	1	1
	Sporidiobolales		
	Incertae sedis	1	4
Tremellomycetes	Cystofilobasidiales		
	<i>Cystofilobasidiaceae</i>	1	1
	Tremellales		
	<i>Tremellaceae</i>	2	8
Ustilaginomycetes	Ustilaginales		
	<i>Ustilaginaceae</i>	2	2
Desconocidos		?	2
ZYGOMYCOTA			
Incertae sedis	Mucorales		
	<i>Cunninghamellaceae</i>	1	1
	<i>Mucoracellaceae</i>	1	1
	Mortierellales		
	<i>Mortierellaceae</i>	1	2
TOTAL	-	130	356

Apéndice 3. Especies desconocidas aisladas de los 4 hospedadores.

Nº AISLADO	Nº REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	Nº DE AISLADOS			HOSPEDADOR
			Hojas	Raíces	Total	
179	AM262387	Ascomycete desconocido 1	1	0	1	<i>Dactylis glomerata</i>
743	AM262372	Ascomycete desconocido 2	1	0	1	
1353	AM262373	Ascomycete desconocido 3	1	0	1	
1408	AM262374	Ascomycete desconocido 4	1	0	1	
1437	AM262377	Ascomycete desconocido 5	1	0	1	
1438	AM262375	Ascomycete desconocido 6	1	0	1	
1459	AM262376	Ascomycete desconocido 7	1	0	1	
1476	AM262389	Ascomycete desconocido 8	1	0	1	
1489	AM262378	Ascomycete desconocido 9	1	0	1	
1495	AM262379	Ascomycete desconocido 10	1	0	1	
1519	AM262380	Ascomycete desconocido 11	1	0	1	
1583	AM262388	Ascomycete desconocido 12	1	0	1	
1797	AM262381	Ascomycete desconocido 13	1	0	1	
1813	AM262385	Ascomycete desconocido 14	1	0	1	
1833	AM262382	Ascomycete desconocido 15	0	1	1	
1841	AM262383	Ascomycete desconocido 16	1	0	1	
1859	AM262384	Ascomycete desconocido 17	1	0	1	
1629	AM262386	Basidiomycete desconocido	1	0	1	
1144	AM921703	Helotiales sin identificar A	2	2	4	<i>Ammophila arenaria</i>
1959	AM924158	Helotiales sin identificar B	0	1	1	
1111	AM921704	Sordariales sin identificar	4	0	4	
979	AM921729	Pleosporales sin identificar A	0	1	1	
1117	AM921730	Pleosporales sin identificar B	0	1	1	
1249	AM921731	Xylariaceae sin identificar	1	0	1	
2847	AM921701	Ascomycete desconocido 1	19	3	22	
2684	AM921735	Ascomycete desconocido 2	0	4	4	
2770	AM921711	Ascomycete desconocido 3	2	0	2	
2939	AM921739	Ascomycete desconocido 4	0	2	2	
3070	AM921712	Ascomycete desconocido 5	2	0	2	
1932	AM921737	Ascomycete desconocido 6	0	1	1	
2348	AM921732	Ascomycete desconocido 7	0	1	1	
2555	AM921745	Ascomycete desconocido 8	1	0	1	
2680	AM921746	Ascomycete desconocido 9	0	1	1	
2991	AM921733	Ascomycete desconocido 10	1	0	1	
3062	AM921734	Ascomycete desconocido 11	1	0	1	
3071	AM924167	Ascomycete desconocido 15	1	0	1	
4046	AM922221	Coelomycete sin identificar	1	0	1	<i>Elymus farctus</i>
2710	AM922218	Pleosporales sin identificar C	0	1	1	
4041	AM922219	Xylariales sin identificar	1	0	1	
1959	AM924158	Helotiales sin identificar B	1	3	4	
2702	AM922199	Ascomycete desconocido 12	1	5	6	
4052	AM922203	Ascomycete desconocido 13	2	0	2	
2707	AM922220	Ascomycete desconocido 14	0	1	1	
2859	AM924167	Ascomycete desconocido 15	0	1	1	
2696	AM922223	Basidiomycete desconocido	1	0	1	

Apéndice 3. Continuación.

N° AISLADO	N° REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS			HOSPEDADOR
			Hojas	Raíces	Total	
2050	-	Pleosporales sin identificar	2	0	2	<i>Holcus lanatus</i>
2012	-	Xylariales sin identificar	1	0	1	
2829	-	Ascomycete desconocido 1	7	0	7	
2816	-	Ascomycete desconocido 2	3	0	3	
3327	-	Ascomycete desconocido 3	2	0	2	
3492	-	Ascomycete desconocido 4	2	0	2	
2113	-	Ascomycete desconocido 5	1	0	1	
2116	-	Ascomycete desconocido 6	1	0	1	
2128	-	Ascomycete desconocido 7	1	0	1	
2190	-	Ascomycete desconocido 8	1	0	1	
2194	-	Ascomycete desconocido 9	1	0	1	
2401	-	Ascomycete desconocido 10	1	0	1	
2429	-	Ascomycete desconocido 11	1	0	1	
2812	-	Ascomycete desconocido 12	1	0	1	
2839	-	Ascomycete desconocido 13	1	0	1	
3208	-	Ascomycete desconocido 14	1	0	1	
3251	-	Ascomycete desconocido 15	1	0	1	
3259	-	Ascomycete desconocido 16	1	0	1	
3267	-	Ascomycete desconocido 17	1	0	1	
3338	-	Ascomycete desconocido 18	1	0	1	
3351	-	Ascomycete desconocido 19	1	1	2	
3403	-	Ascomycete desconocido 20	1	0	1	
3412	-	Ascomycete desconocido 21	1	0	1	
3538	-	Ascomycete desconocido 22	1	0	1	
3542	-	Ascomycete desconocido 23	1	0	1	
3583	-	Ascomycete desconocido 24	1	0	1	
3679	-	Ascomycete desconocido 25	1	0	1	
3704	-	Ascomycete desconocido 26	1	0	1	
3706	-	Ascomycete desconocido 27	1	0	1	
3809	-	Ascomycete desconocido 28	1	0	1	
3844	-	Ascomycete desconocido 29	1	1	2	
3972	-	Ascomycete desconocido 30	1	1	2	
3211	-	Ascomycete desconocido 31	0	2	2	
3364	-	Ascomycete desconocido 32	0	2	2	
3891	-	Ascomycete desconocido 33	0	2	2	
3936	-	Ascomycete desconocido 34	0	2	2	
3967	-	Ascomycete desconocido 35	0	2	2	
3210	-	Ascomycete desconocido 36	0	1	1	
3236	-	Ascomycete desconocido 37	0	1	1	
3284	-	Ascomycete desconocido 38	0	1	1	
3363	-	Ascomycete desconocido 39	0	1	1	
3423	-	Ascomycete desconocido 40	0	1	1	
3434	-	Ascomycete desconocido 41	0	1	1	
3461	-	Ascomycete desconocido 42	0	1	1	
3487	-	Ascomycete desconocido 43	0	1	1	
3541	-	Ascomycete desconocido 44	0	1	1	
3789	-	Ascomycete desconocido 45	0	1	1	
3804	-	Ascomycete desconocido 46	0	1	1	
3817	-	Ascomycete desconocido 47	0	1	1	

Apéndice 3. Continuación.

N° AISLADO	N° REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN PROPUESTA	N° DE AISLADOS			HOSPEDADOR
			Hojas	Raíces	Total	
3847	-	Ascomycete desconocido 48	0	1	1	<i>Holcus lanatus</i>
3855	-	Ascomycete desconocido 49	0	1	1	
3857	-	Ascomycete desconocido 50	0	1	1	
3874	-	Ascomycete desconocido 51	0	1	1	
3894	-	Ascomycete desconocido 52	0	1	1	
3966	-	Ascomycete desconocido 53	0	1	1	

Apéndice 4. Especies y géneros de endofitos aislados e identificados, que han sido comunes a 2, 3, ó a los 4 hospedadores del estudio.

ENDOFITOS AISLADOS EN	TAXONES	GÉNEROS
4 hospedadores	<i>Acremonium strictum</i> <i>Alternaria</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Cordyceps bassiana</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Phaeosphaeria</i> sp. <i>Podospora</i> sp. <i>Stemphylium solani</i>	<i>Acremonium</i> <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Cordyceps</i> <i>Penicillium</i> <i>Phaeosphaeria</i> <i>Podospora</i> <i>Stemphylium</i>
3 hospedadores	<i>Acremonium alternatum</i> <i>Acremonium</i> sp. <i>Arthrinium</i> sp. A <i>Arthrinium</i> sp. <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Chaetomium</i> sp. <i>Coniothyrium cereale</i> <i>Curvularia inaequalis</i> <i>Drechslera</i> sp. <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i> <i>Plectosphaerella cucumerina</i> <i>Torrubiella confragosa</i>	<i>Acremonium</i> <i>Arthrinium</i> <i>Aureobasidium</i> <i>Chaetomium</i> <i>Coniothyrium</i> <i>Curvularia</i> <i>Drechslera</i> <i>Epicoccum</i> <i>Gaeumannomyces</i> <i>Plectosphaerella</i> <i>Torrubiella</i>
2 hospedadores	<i>Acremonium</i> sp. A <i>Arthrinium</i> sp. B <i>Aspergillus terreus</i> <i>Chaetomium funicola</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Cryptococcus victoriae</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Discula quercina</i> <i>Emericellopsis</i> sp. <i>Engyodontium album</i> <i>Epicoccum</i> sp. <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Gliomastix murorum</i> <i>Helgardia anguioides</i> <i>Leptosphaeria</i> sp. A <i>Leptosphaeria</i> sp. B <i>Leptosphaeria</i> sp. <i>Lophodermium</i> sp. <i>Microdochium bolleyi</i> <i>Neofabraea alba</i> <i>Nigrospora oryzae</i> <i>Nigrospora</i> sp. <i>Oidiodendron</i> sp. <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Penicillium</i> sp. D <i>Penicillium</i> sp. E <i>Periconia macrospinoso</i> <i>Pestalotiopsis</i> sp. A	<i>Acremonium</i> <i>Arthrinium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Chaetomium</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Discula</i> <i>Emericellopsis</i> <i>Engyodontium</i> <i>Epicoccum</i> <i>Fusarium</i> <i>Gliomastix</i> <i>Helgardia</i> <i>Leptosphaeria</i> <i>Lophodermium</i> <i>Microdochium</i> <i>Neofabraea</i> <i>Nigrospora</i> <i>Oidiodendron</i> <i>Penicillium</i> <i>Periconia</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Phialemonium</i> <i>Phoma</i> <i>Phomopsis</i> <i>Preussia</i> <i>Pyrenochaeta</i> <i>Schizothecium</i> <i>Thielavia</i> <i>Trametes</i> <i>Trichoderma</i>

Apéndice 4. Continuación.

ENDOFITOS AISLADOS EN	TAXONES	GÉNEROS
2 hospedadores	<i>Pestalotiopsis</i> sp. B <i>Phialemonium dimorphosporum</i> <i>Phoma</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. A <i>Phomopsis</i> sp. B <i>Preussia australis</i> <i>Pyrenochaeta</i> sp. <i>Schizothecium</i> sp. <i>Thielavia</i> sp. <i>Trametes versicolor</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Ulocladium</i> sp. <i>Verticillium nigrescens</i> Helotiales sin identificar B Ascomycete desconocido 2859	<i>Ulocladium</i> <i>Verticillium</i>

Apéndice 5. Localidades de muestreo y n° de especies que fueron identificadas según la estación del año y el hospedador asociado.

ESTACIÓN MUESTREO	HOSPEDADOR	N° LOCA- LIDADES	N° PLANTAS	N° ESPECIES IDENTIFICADAS	\bar{x} POR PLANTA
Primavera	<i>Dactylis glomerata</i>	8	92	53	0,58
	<i>Ammophila arenaria</i>	2	14	27	1,93
	<i>Elymus farctus</i>	2	14	11	0,79
	<i>Holcus lanatus</i>	13	91	133	1,46
	Total	25	211	192*	0,91
Verano	<i>Dactylis glomerata</i>	-	-	-	-
	<i>Ammophila arenaria</i>	3	21	34	1,62
	<i>Elymus farctus</i>	3	21	31	1,48
	<i>Holcus lanatus</i>	8	56	78	1,39
	Total	14	98	115*	1,17
Otoño	<i>Dactylis glomerata</i>	2	4	7	1,75
	<i>Ammophila arenaria</i>	2	14	23	1,64
	<i>Elymus farctus</i>	2	14	16	1,14
	<i>Holcus lanatus</i>	1	7	17	2,43
	Total	7	39	50*	1,28
Invierno	<i>Dactylis glomerata</i>	4	16	37	2,31
	<i>Ammophila arenaria</i>	2	14	32	2,29
	<i>Elymus farctus</i>	2	14	21	1,50
	<i>Holcus lanatus</i>	1	7	27	3,86
	Total	9	51	92*	1,80

Nota. *El total de especies identificadas no coincide con la suma de las filas anteriores debido a que se identificaron.

Apéndice 6. Especies identificadas en el estudio, según la época del año en que fueron aisladas.

PRIMAVERA		
<i>Acremonium alternatum</i>	<i>Didymella bryoniae</i>	<i>Mucor hiemalis</i>
<i>Acremonium cyanophagus</i>	<i>Discula quercina</i>	<i>Mycena</i> sp.
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Drechslera biseptata</i>	<i>Neofabraea alba</i>
<i>Acremonium</i> sp. B	<i>Drechslera dactylidis</i>	<i>Neosartorya</i> sp.
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Drechslera erythrospila</i>	<i>Nigrospora oryzae</i>
<i>Agrocybe pediades</i>	<i>Drechslera</i> sp. A	<i>Nigrospora</i> sp.
<i>Altenaria</i> sp.	<i>Drechslera</i> sp. B	<i>Oidiodendron</i> sp.
<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Drechslera</i> sp.	<i>Paecilomyces carneus</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Emericellopsis</i> sp.	<i>Penicillium brevicompactum</i>
<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Engyodontium album</i>	<i>Penicillium thomii</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Epichloë clarkii</i>	<i>Penicillium virgatum</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. C
<i>Auxarthron conjugatum</i>	<i>Eupenicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Periconia macrospinoso</i>
<i>Ceratobasidium</i> sp.	<i>Eutypella cerviculata</i>	<i>Periconiella</i> sp.
<i>Chaetomium funicola</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp. B
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Petriella guttulata</i>
<i>Chaetomium</i> sp. B	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	<i>Phaeosphaeria luctuosa</i>
<i>Cochliobolus sativus</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>Phaeosphaeria</i> sp.
<i>Coniochaeta ligniaria</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>
<i>Coniothyrium cereale</i>	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	<i>Phialocephala scopiformis</i>
<i>Coprinellus disseminatus</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	<i>Phialophora alba</i>
<i>Coprinellus radians</i>	<i>Glarea</i> sp.	<i>Phialophora</i> sp. B
<i>Coprinus micaceus</i>	<i>Glomerella lagenaria</i>	<i>Phoma herbarum</i>
<i>Cordyceps bassiana</i>	<i>Gnomonia petiolorum</i>	<i>Phoma terrestris</i>
<i>Cordyceps sinensis</i>	<i>Helgardia anguioides</i>	<i>Phoma</i> sp.
<i>Creosphaeria sassafras</i>	<i>Helicosporium pallidum</i>	<i>Phomopsis columnaris</i>
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Kabatiella</i> sp.	<i>Phomopsis amygdali</i>
<i>Cryptococcus victoriae</i>	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	<i>Phomopsis</i> sp. A
<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Leptodontidium</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp. B
<i>Cryptodiaporthe salicella</i>	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	<i>Phomopsis</i> sp. C
<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp. B	<i>Phomopsis</i> sp.
<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	<i>Lophodermium</i> sp.	<i>Podospora</i> sp.
<i>Dactylaria</i> sp.	<i>Microdochium bolleyi</i>	<i>Preussia isomera</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Microdochium nivale</i>	<i>Preussia</i> sp.
<i>Diaporthe melonis</i>	<i>Microdochium</i> sp.	<i>Pyrenochaeta</i> sp.
<i>Diaporthe viticola</i>	<i>Mortierella</i> sp.	<i>Rhodotorula bacarum</i>

Apéndice 6. Continuación.

PRIMAVERA		
<i>Rhodotorula minuta</i>	Ascomycete desconocido 1519	Ascomycete desconocido 3360
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	Ascomycete desconocido 1583	Ascomycete desconocido 3363
<i>Schizothecium</i> sp.	Ascomycete desconocido 1797	Ascomycete desconocido 3364
<i>Sordaria macrospora</i>	Ascomycete desconocido 1833	Ascomycete desconocido 3403
<i>Sporormia subticinensis</i>	Ascomycete desconocido 1841	Ascomycete desconocido 3412
<i>Stagonospora</i> sp.	Ascomycete desconocido 1859	Ascomycete desconocido 3423
<i>Stemphylium solani</i>	Ascomycete desconocido 2847	Ascomycete desconocido 3434
<i>Sydowia polyspora</i>	Ascomycete desconocido 2939	Ascomycete desconocido 3461
<i>Thielavia</i> sp.	Ascomycete desconocido 2991	Ascomycete desconocido 3487
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	Ascomycete desconocido 3062	Ascomycete desconocido 3492
<i>Trametes versicolor</i>	Ascomycete desconocido 3070	Ascomycete desconocido 3538
<i>Trichocladium opacum</i>	Ascomycete desconocido 3071	Ascomycete desconocido 3541
<i>Trichocladium</i> sp.	Ascomycete desconocido 3210	Ascomycete desconocido 3542
<i>Trichoderma viride</i>	Ascomycete desconocido 3211	Ascomycete desconocido 3583
<i>Ulocladium</i> sp.	Ascomycete desconocido 3236	Ascomycete desconocido 3679
<i>Valsa sordida</i>	Ascomycete desconocido 3284	Ascomycete desconocido 3704
<i>Valsa</i> sp.	Ascomycete desconocido 3208	Ascomycete desconocido 3706
<i>Verticillium nigrescens</i>	Ascomycete desconocido 3251	Ascomycete desconocido 3789
<i>Verticillium</i> sp.	Ascomycete desconocido 3259	Ascomycete desconocido 3804
<i>Xylaria</i> sp.	Ascomycete desconocido 3267	Ascomycete desconocido 3809
Pleosporales sin identificar B	Ascomycete desconocido 3327	Ascomycete desconocido 3817
Ascomycete desconocido 1489	Ascomycete desconocido 3338	Ascomycete desconocido 3891
Ascomycete desconocido 1495	Ascomycete desconocido 3351	Basidiomycete desconocido 1629
VERANO		
<i>Acremonium alternatum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium poae</i>
<i>Acremonium</i> sp. A	<i>Cochliobolus sativus</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>
<i>Acremonium</i> sp. B	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Acremonium</i> sp. C	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Coniothyrium cereale</i>	<i>Garbarnaudia</i> sp.
<i>Alternaria citri</i>	<i>Cryptococcus victoriae</i>	<i>Gibberella avenacea</i>
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Cryptococcus</i> sp. A	<i>Gliomastix murorum</i>
<i>Arthrinium</i> sp. A	<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Glomerella graminicola</i>
<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Dactylaria</i> sp.	<i>Guignardia philoprina</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Discostroma</i> sp.	<i>Hypoxylon</i> sp.
<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Drechslera</i> sp. A	<i>Lachnum</i> sp.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Drechslera</i> sp.	<i>Leptodontidium</i> sp.
<i>Botryosphaeria australis</i>	<i>Epichloë clarkii</i>	<i>Leptosphaeria</i> sp. B
<i>Chaetomium funicola</i>	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
<i>Chaetomium</i> sp. A	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Meira</i> sp.
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Microdochium bolleyi</i>

Apéndice 6. Continuación.

VERANO		
<i>Microdochium</i> sp.	<i>Phialocephala</i> sp.	Helotiales sin identificar B
<i>Minimidochium</i> sp.	<i>Phoma pinodella</i>	Pleosporales sin identificar A
<i>Myrothecium</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.	Ascomycete desconocido 1932
<i>Neofabraea alba</i>	<i>Phomopsis</i> sp. A	Ascomycete desconocido 2770
<i>Nigrospora oryzae</i>	<i>Phomopsis</i> sp. C	Ascomycete desconocido 2847
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Pleosporales</i> sp.	Ascomycete desconocido 2113
<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Podospora</i> sp.	Ascomycete desconocido 2116
<i>Penicillium canescens</i>	<i>Pseudozyma aphidis</i>	Ascomycete desconocido 2128
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Ascomycete desconocido 2190
<i>Penicillium</i> sp. A	<i>Schizothecium</i> sp.	Ascomycete desconocido 2194
<i>Penicillium</i> sp. B	<i>Stemphylium solani</i>	Ascomycete desconocido 3844
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Thielavia</i> sp.	Ascomycete desconocido 3847
<i>Pestalotiopsis</i> sp. A	<i>Ulocladium</i> sp.	Ascomycete desconocido 3855
<i>Pestalotiopsis</i> sp. B	<i>Verticillium nigrescens</i>	Ascomycete desconocido 3857
<i>Phaeosphaeria</i> sp. A	<i>Verticillium</i> sp.	Ascomycete desconocido 3874
<i>Phaeosphaeria</i> sp. B	<i>Xylaria</i> sp. A	Ascomycete desconocido 3891
<i>Phaeosphaeria</i> sp. C	<i>Xylaria</i> sp. B	Ascomycete desconocido 3894
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Coelomycete sin identificar B	Ascomycete desconocido 3972
<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	Xylariales	Ascomycete desconocido 4052
<i>Phialemonium</i> sp.	Helotiales sin identificar A	Basidiomycete desconocido 2696
OTOÑO		
<i>Acremonium alternatum</i>	<i>Epichloë typhina</i>	<i>Podospora</i> sp.
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Stagonospora</i> sp.
<i>Acremonium</i> sp. A	<i>Fusarium poae</i>	<i>Tilletiopsis pallescens</i>
<i>Acremonium</i> sp. B	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	<i>Torrubiella confragosa</i>
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Kondoa aerea</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Altenaria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp. A	<i>Ulocladium</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Microdochium bolleyi</i>	Coelomycete sin identificar B
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Neofabraea alba</i>	Xylariales
<i>Chaetomium</i> sp. B	<i>Nigrospora</i> sp.	Xylariaceae 2535
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Penicillium canescens</i>	Ascomycete desconocido 743
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	Ascomycete desconocido 2348
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp. B	Ascomycete desconocido 2401
<i>Coniothyrium cereale</i>	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Ascomycete desconocido 2429
<i>Cordyceps bassiana</i>	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	Ascomycete desconocido 2555
<i>Curvularia inaequalis</i>	<i>Phlebia radiata</i>	Ascomycete desconocido 2680
<i>Drechslera</i> sp.	<i>Phyllosticta pyrolae</i>	Ascomycete desconocido 2816
<i>Emericellopsis</i> sp.	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	

Apéndice 6. Continuación.

INVIERNO		
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Gliomastix murorum</i>	<i>Preussia australis</i>
<i>Acremonium</i> sp. B	<i>Helgardia anguioides</i>	<i>Preussia minima</i>
<i>Acremonium</i> sp. C	<i>Hypoxylon fuscum</i>	<i>Pseudeurotium bakeri</i>
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Kondoa aerea</i>	<i>Sarea</i> sp.
<i>Altenaria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp. A	<i>Septoria passerinii</i>
<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp. B	<i>Stagonospora arenaria</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Stagonospora</i> sp.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Lophiostoma</i> sp.	<i>Stemphylium solani</i>
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Lophodermium</i> sp.	<i>Torrubiella confragosa</i>
<i>Chaetosphaeria</i> sp.	<i>Mastigobasidium intermedium</i>	<i>Trametes ochracea/versicolor</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Microdochium bolleyi</i>	<i>Volutella ciliata</i>
<i>Colletotrichum trichellum</i>	<i>Microdochium phragmitis</i>	Coelomycete sin identificar B
<i>Coniothyrium cereale</i>	<i>Microdochium</i> sp.	Helotiales sin identificar A
<i>Cordyceps bassiana</i>	<i>Mortierella alpina</i>	Helotiales sin identificar B
<i>Cryptococcus victoriae</i>	<i>Mycoarthritis corallinus</i>	Xylariales
<i>Cryptococcus</i> sp. B	<i>Neofabraea alba</i>	Ascomycete desconocido 1353
<i>Cryptococcus</i> sp. C	<i>Penicillium</i> sp.	Ascomycete desconocido 1408
<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp. A	Ascomycete desconocido 1437
<i>Dioszegia hungarica</i>	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	Ascomycete desconocido 1438
<i>Drechslera andersenii</i>	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Ascomycete desconocido 1459
<i>Drechslera biseptata</i>	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	Ascomycete desconocido 2684
<i>Drechslera dactylidis</i>	<i>Phialophora</i> sp. A	Ascomycete desconocido 2702
<i>Drechslera</i> sp.	<i>Phoma glomerata</i>	Ascomycete desconocido 2707
<i>Embellisia</i> sp.	<i>Phoma pinodella</i>	Ascomycete desconocido 2770
<i>Engyodontium album</i>	<i>Phoma</i> sp.	Ascomycete desconocido 2839
<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Ascomycete desconocido 2812
<i>Eupenicillium tropicum</i>	<i>Phomopsis</i> sp. B	Ascomycete desconocido 2816
<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Phomopsis</i> sp. C	Ascomycete desconocido 2829
<i>Fusarium poae</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	Ascomycete desconocido 2847
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pleurophoma cava</i>	Ascomycete desconocido 3070
<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	<i>Podospora</i> sp.	

BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman B.A., Manrique F.E., Jaramillo L.V., Guerrero S.P., Miranda S.J.A., Núñez T.I., Chimal H.A. 1987. Las gramíneas de México, Tomo II. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Comisión Técnico Consultiva de Coeficientes de Agostadero. México, D.F.
- Adler P.B. y Lauenroth W.K. 2003. The power of time: spatiotemporal scaling of species diversity. *Ecology Letters*, 6: 749-756.
- Agrios G.N. 2005. *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego.
- Andersen B., Krøger E., Roberts R.G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*, 106: 170-182.
- Apinis A.E. y Chesters C.G.C. 1964. Ascomycetes of some salt marshes and sand dunes. *Transactions of the British Mycological Society*, 47: 419-435.
- Appel D.J. y Gordon T.R. 1996. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9: 125-138.
- Arnold A.E. 2006. Endophytic fungi: hidden components of tropical forest community ecology. En: *Tropical Forest Community Ecology*. Capítulo 15. (eds. Schnitzer S., Carson, W.). Blackwell Scientific, Inc. pp: 254-271.
- Arnold A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21:51-66.
- Arnold A.E. y Lutzoni F. 2007. Diversity an host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?. *Ecology*, 88: 541-549.
- Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G.S., Coley P.D., Kursar T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecology Letters*, 3: 267-274.

- Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, 105: 1502-1507.
- Arnold A.E., Mejia L.C., Kylo D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 26: 15649-15654.
- Arnold A.E., Henk D.A., Eells R.L., Lutzoni F., Vilgalys R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99: 185-206.
- Arroyo G.R., Martínez Zapater J.M., García Criado B., Zabalgogezcoa I. 2002. Genetic structure of natural populations of the grass endophyte *Epichloë Festucae* in semiarid grasslands. *Molecular Ecology*, 11: 355–364.
- Atlas R.M. y Cerniglia C.E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *BioScience*, 45: 332–338.
- Backman P.A. y Sikora R.A. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46: 1-3.
- Bacon C.W. y Hill N.S. 1996. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. En *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants. Systematics, Ecology, and Evolution* (eds. S.C. Redlin y L.M. Caris). APS Press. Pp. 155 –178.
- Bacon C.W. y Hinton D.M. 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany*, 74: 1195–1202.
- Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D., Luttrell E.S. 1977. *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 576-581.
- Barata M. 2002. Fungi on the halophyte *Spartina maritima* in salt marshes. En: *Fungi in marine environments* (ed. K.D. Hyde). Fungal Diversity Research Series, 7: 179-193.
- Barnett H.L. y Hunter B.B. 1998. *Illustrated genera of imperfecti fungi*. 4ª edición. Burgess. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA.
- Baura G., Szaro T.M., Bruns T.D. 1992. *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. *Mycologia*, 84: 592-597.

- Bayman P. y Bennett J.W. 2004. Nitrate-nonutilizing mutants and vegetative self-incompatibility in *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*. *Biotechnology Letters*, 20: 901–903.
- Bayman P., Lebrón L., Tremblay R., Lodge D.J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves on *Lepanthes* (*Orchidaceae*). *New Phytologist*, 135: 143–149.
- Bazely D.R., Vicari M., Emmerich S., Filip L., Lin D., Inman A. 1997. Interactions between herbivores and endophyte-infected *Festuca rubra* from the Scottish islands of St. Kilda, Benbecula and Rum. *Journal of Applied Ecology*, 34: 847–860.
- Becerra P. y Faúndez L. 2001. Vegetación del desierto interior de Quillagua, Región de Antofagasta (II), Chile. *Chloris Chilensis*, Año 4, N° 2.
- Bernstein M.E y Carroll G.C. 1977. Internal fungi in old – growth Douglas fir foliage. *Canadian Journal of Botany*, 55: 644–653.
- Bills G.F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. En: *Endophytic fungi in grasses and woody plants* (eds. S.C. Erdlin, L.M. Carris). APS Press, USA. Páginas 31–65.
- Bills G.F. y Polishook J.D. 1994. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia*, 86: 187–198.
- Bisseger M. y Sieber T.N. 1994. Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. *Mycologia*, 86: 648–655.
- Bogan B.W. y Lamar R.T. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degradating capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1597–1603.
- Bordallo J.J., López Llorca L.V., Jansson H.B., Salinas J., Persmark L., Asensio L. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode trapping fungi. *New Phytologist*, 154: 491–499.
- Bousquet J., Simon L., Lalonde M. 1990. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forest Research*, 20: 254–257.

- Bouton J. y Easton S. 2005. Endophytes in forage cultivars. En: *Neotyphodium in cold season grasses* (eds. C.A. Roberts, C.P. West, D.E. Spiers). Blackwell publishing, Iowa: 327-340.
- Bouton J.H., Gates R.N., Belesky D.P., Owsley M. 1993. Yield and persistence of tall fescue in the Southeastern coastal plain after removal of its endophyte. *Agronomy Journal*, 85: 52-55.
- Bray J.R. y Curtis J.T. 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27: 326-349.
- Breen J.P. 1994. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Review of Entomology*, 39: 401-423.
- Brilman L.A. 2005. Endophytes in turfgrass cultivars. En: *Neotyphodium in cool season grasses* (eds. Roberts C.A., West C.P., Spiers D.E.). Blackwell Publishing, Iowa, USA. Páginas 341-349.
- Bruns T.D., Fogel R., Taylor J.W. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia*, 82:175-184.
- Bullerman L.B. 1997. Fusaria and toxigenic molds and other Aspergilli and Penicillia. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (eds. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ). ASM Press, Washington. Páginas 419-434.
- Bunge J. y Fitzpatrick M. 1993. Estimating the number of species: A Review. *Journal of the American Statistical Association*, 88: 364-373.
- Carroll G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. En: *Microbiology of the Phyllosphere* (eds. Fokkema NJ, van den Huevel J). Cambridge University Press, Cambridge. Páginas 205–222.
- Carroll G.C. 1995. Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1316-1324.
- Chao A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11: 265-270.
- Chakravarti I.M., Laha R.G., Roy J. 1967. En: *Handbook of Methods of Applied Statistics*. Volume I: Techniques of Computation, Descriptive Methods, and Statistical Inference (eds. John Wiley). Nueva York. Páginas 392-394.

- Chao A. 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 43: 783-791.
- Chao A. y Lee S.M. 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association*, 87: 210-217.
- Chazdon R.L., Colwell R.K., Denslow J.S., Guariguata M.R. 1998. Statistical methods for estimating species richness of woody regeneration in primary and secondary rain forests of NE Costa Rica. En: *Forest biodiversity research, monitoring and modeling: Conceptual background and Old World case studies*. (eds. F. Dallmeier, J.A. Comiskey). Parthenon Publishing, France. Páginas 285-309.
- Chen J., Mirocha C.J., Xie W., Hogge L., Olson D. 1992. Production of the Mycotoxin Fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3928-3931.
- Clarke B.B., White J.F., Hurley H., Torres M.S., Sun S., Huff D.R. 2006. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*, 90: 994-998.
- Clay K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 275-295.
- Clay K. 1993. The ecology and evolution of endophytes. *Agriculture, Ecosystems, and Environment*, 44: 39-64.
- Clay K. y Holah J. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, 285: 1742-1744.
- Clay K., Marks S., Cheplick G.P. 1993. Effects of Insect Herbivory and Fungal Endophyte Infection on Competitive Interactions Among Grasses. *Ecology*, 74: 1767-1777.
- Collado J., Platas G., González I., Peláez F. 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist*, 144: 525-532.
- Collado J., Platas G., Paulus B., Bills, G.F. 2007. High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 521-533.
- Colwell R.K. 2005. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. Persistent URL <purl.oclc.org/estimates>.

- Colwell R.K. y Coddington J.A. 1994. *Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation*. Philosophical Transactions of the Royal Society. England, Serie B 345, 101-118.
- Crous P.W., Groenewald J.Z., Gams W. 2003. Eyespot of cereals revisited: ITS phylogeny reveals new species relationships. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 841-850.
- Crozier J., Thomas S.E., Aime M.C., Evans H.C., Holmes K.A. 2006. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*, 55: 783-791.
- Cullings K. 1994. Molecular phylogeny of the Monotropoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the *Pyroloideae*. *Journal of Evolutionary Biology*, 7: 501-516.
- Cullings K.W., Szaro T., Bruns T.D. 1996. Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites. *Nature*, 7: 63-66.
- Cullings K.W. y Vogler D.R. 1998. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: Applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology*, 7: 919-923.
- Danti R., Sieber T.N., Sanguineti G. 2002. Endophytic mycobiota in bark of European beech (*Fagus sylvatica*) in the Apennines. *Mycological Research*, 106: 1343-1348.
- Davidse G. 1987. Fruit dispersal in the Poaceae. En: *Grass Systematics and Evolution* (eds. Soderstrom, T.R., Hilu, K.W., Campbell, C.S., Barkworth, M.E.). Smithsonian Institution Press, 143-155.
- de Bary A. 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Engelmann. Leipzig.
- De Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2ª edición. Utrecht & Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili.
- Dennis R.W.G. 1978. *British Ascomycetes*. J. Cramer. Alemania.
- Dennis R.W.G. 1983. Fungi of *Ammophila arenaria* in Europe. *Revista de Biología*, 12:15-48.
- Desjardins A.E. y Proctor R.H. 2001. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. En: *Fusarium*. (eds. Summerell BA et al.). APS Press, St. Paul, Minnesota. Páginas 122-137.

- Devarajan P.T. y Suryanarayanan T.S. 2006. Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. *Fungal Diversity*, 23: 111-119.
- Díaz P. y Wilmer A. 2007. Inventario preliminar de plantas útiles de bosques remanentes en las Delicias y el Guamo, Serranía de Imataca, Estado Bolívar, Venezuela. *Acta Botánica Venezuelica*, 30: 327-344.
- Dingle J. y McGee P.A. 2003. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research*, 107: 310–316.
- Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. 1997. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington. Páginas 393, 406, 419.
- Duckett J.G., Russell J., Ligrone R. 2006. Basidiomycetous endophytes in jungermannialean (leafy) liverworts have novel cytology and species-specific host ranges: a cytological and experimental study. *Canadian Journal of Botany*, 84: 1075-1093.
- Duong L.M., Jeewon R., Lumyong S., Hyde K.D. 2006. DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. *Fungal Diversity*, 23: 121-138.
- Ellis M.B. 1971a. *Dematiaceus Hyphomycetes*. Commonwealth Agricultural Bureaux (CAB). Cambrian News, Aberystwyth, Dyfed, Reino Unido.
- Ellis M.B. 1971b. *More dematiaceus Hyphomycetes*. Commonwealth Agricultural Bureaux (CAB). Cambrian News, Aberystwyth, Dyfed, Reino Unido.
- Ellis M.B. y Ellis J.P. 1987. *Microfungi on Land Plants. An Identification Handbook*. Croom Helm, Londres.
- Espinosa-García F. y Lagenheim J.H. 1990. The leaf fungal endophytic community of a coastal redwood population – diversity and spatial patterns. *New Phytologist*, 116: 89–97.
- Espinoza M. y Salas E. 2005. Estructura de las comunidades de peces de arrecife en las Islas Catalinas y Playa Ocotal, Pacífico Norte de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 20: 523-536.
- Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P., Rossman A.Y. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, USA.

- Fisher P.J. 1996. Survival and spread of the endophyte *Stagonospora pteridiicola* in *Pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. *New Phytologist*, 132: 119-122.
- Fisher P.J. y Petrini O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*, 120: 137–143.
- Fisher P.J., Petrini O., Petrini L.E., Descals E. 1992. A preliminary study of fungi inhabiting xylem and whole stems of *Olea europea*. *Sydowia*, 44: 117–121.
- Fisher P.J., Petrini O., Sutton B.C. 1993. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. *Sydowia*, 45: 338-345.
- Fisher P.J., Petrini O., Petrini L.E., Sutton B.C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca, and Switzerland. *New Phytologist*, 127: 133–137.
- Fisher P.J., Graf F., Petrini L.E., Sutton B.C., Wookey P.A. 1995. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycology*, 8: 319-323.
- Font Quer P. 1961. *Plantas medicinales. El Dioscórides renovado*. Ed. Labor Lastra Menéndez.
- Fletcher L.R. y Harvey I.C. 1981. An association of *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. *New Zealand Veterinary Journal*, 28: 185–86.
- Freeman E.M. 1904. The seed fungus of *Lolium temulentum* L., the darnel. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 196: 1-27.
- Freeman E.M. 1906. The affinities of the fungus of *Lolium temulentum*, L. *Annual Mycology*, 4: 32-34.
- Freeman S. y Rodriguez R.J. 1993. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*, 260: 75–78.
- Fröhlich J. y Hyde K.D. 1999. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic?. *Biodiversity Conservation*, 8: 977-1004.
- Fröhlich J., Hyde K.D., Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*, 104: 1202-1212.

- Gallagher R.T., Hawkes A.D., Steyn P.S., Vleggaar R. 1984. Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorder of livestock: structure elucidation of lolitrem B. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*, 9: 614–616.
- Gallery R., Dalling J.W., Arnold A.E. 2007. Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with neotropical *Cecropia*. *Ecology*, 88: 582–588.
- Gamboa M.A. y Bayman P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*, 33: 352–360.
- Gange A.C., Dey S., Currie A.F., Sutton B.C. 2007. Site-and species specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants. *Journal of Ecology*, 95: 614–622.
- Ganley R.J. y Newcombe G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*, 110: 318–327.
- Gemma J.N. y Koske R.E. 1997. Arbuscular Mycorrhizae in Sand Dune Plants of the North Atlantic Coast of the U.S.: Field and Greenhouse Inoculation and Presence of Mycorrhizae in Planting Stock. *Journal of Environmental Management*, 50: 251–264.
- Giovannetti M. y Mosse B. 1980. An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. *New Phytologist*, 84: 489–500.
- Girlanda M., Ghignone S., Luppi A.M. 2002. Diversity of sterile root-associated fungi of two Mediterranean plants. *New Phytologist*, 155: 481 – 498.
- Glenn A.E., Bacon C.W., Price R., Hanlin R.T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*, 88: 369–83.
- González-Chávez C., D’Haen J., Vangronsveld J., Dodd J.C. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil*, 240: 287–297.
- Gotelli N.J. y Colwell R.K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4: 379–391.
- Gove, J.H., Patil, G.P., Swindel, B.F., Taillie, C. 1994. Ecological diversity and forest management. En: *Handbook of Statistics. Volume 12: Environmental Statistics*. (eds. G.P. Patil, C.R. Rao, Ross N.P.). North Holland/Elsevier Science Publishers, Nueva York. Páginas 409–462.

- Gravesen S. 1979. Fungi as a cause of allergic disease. *Allergy*, 34: 135-154.
- Gravesen S. 1994. Allergic and non-allergic manifestations related to indoor fungal exposuremanagement of cases. En: *Health implications of fungi in indoor air environment* (eds. Samson R.A., Flannigan B., Flannigan M.E., Verhoeff A.P.). Elsevier, Amsterdam. Páginas 241-248.
- Guerin D. 1898a. Sur la presence d'un Champignon dans l'Ivraie. *Journal of Botany*, 12: 230-238.
- Guerin D. 1898b. Apropos de la Presence d'un Champignon clans l'Ivraie (*Lolium temulenturn*, L.). *Journal of Botany*, 12: 384 385.
- Guo L.D., Hyde K.D., Liew E.C.Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist*, 147: 617-630.
- Guo L.D., Huang G.R., Wang Y., He W.H., Zheng W.H., Hyde K.D. 2003. Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycological Research*, 107: 680-688.
- Hallmann J. y Sikora R.A. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 155-162.
- Hamby R.K., Sims L., Issel L., Zimmer E. 1988. Direct ribosomal RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing methods for work with higher plants. *Plant Molecular Biology*, 6: 175-192.
- Hamby R.K. y Zimmer E.A. 1988. Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (*Poaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 160: 29-37.
- Hammon K.E. y Faeth S.H. 1992. Ecology of plantherbivore communities: a fungal component?. *Natural Toxins*, 1: 197-208.
- Hanausek T.F. 1898. Vorlaufige Mittheilung uber den von A. Vogl in der Frucht von *Lolium temulentum* entdeckten Pilz. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 16: 203.
- Hanlin R.T. 2001a. *Illustrated genera of Ascomycetes*. Volumen I. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA.

- Hanlin R.T. 2001b. *Illustrated genera of Ascomycetes*. Volumen II. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA.
- Hata K. y Sone K. 2008. Isolation of endophytes from leaves of *Neolitsea sericea* in broadleaf and conifer stands. *Mycoscience*, 49: 229-232.
- Hawksworth D.L. 1988. The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 96: 3-20.
1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95: 641-655.
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105: 1422-1432.
- Hawksworth D.L. y Rossman A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi?. *Phytopathology*, 87: 888-891.
- Heenan C.N., Shaw K.J., Pitt J.I. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*, 1: 67-72.
- Heltsche J.F. y Forrester N.E. 1983. Estimating species richness using the jackknife procedure. *Biometrics*, 39: 1-11.
- Herskovitz M.A. y Lewis L.A. 1996. Deep-level diagnostic value of the rRNA-ITS region. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 1276-1295.
- Higgins K.L., Arnold A.E., Miadlikowska J., Sarvate S.D., Lutzoni F. 2006. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 543-555.
- Hill I.R., Shaw J.L., Maund S.J. 1994. Review of aquatic field tests with pyrethroid insecticides. En: *Freshwater field tests for hazard assessment of chemicals*. (ed. I.R. Hill). Lewis Publishers (Boca Raton, FL).
- Hirsch G. y Braun U. 1992. Communities of parasitic microfungi. En: *Handbook of Vegetation Science*. Volumen 19: Fungi in Vegetation Science (ed. Winterhoff FY). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. pp-225-250.

- Hocking A.D. 1997. Toxigenic *Aspergillus* species. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (eds. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ). ASM Press, Washington. Páginas 393-405
- Hoveland C.S. 1993. Importance and economic significance of the *Acremonium* endophytes to performance of animals and grass plant. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 44: 3-12.
- Hubbard C.E. 1984. *Grasses. A guide to their structure, identification, uses and distribution in the British Isles*. Penguin Books, Londres, Reino Unido.
- Hunter C.A., Grant C., Flannigan B., Bravery A.F. 1988. Moulds in buildings: the air spora of domestic dwellings. *International Biodeterioration*, 24: 81-101.
- Inácio M.L., Silva G.H., Teles H.L., Trevisan H.C., Cavaleiro A.J., Bolzani V.S., Young M.C.M., Pfenning L.H., Araujo A.R. 2006. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (*Lauraceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34: 822-824.
- Istifadah N. y McGee P.A. 2006. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australasian Plant Pathology*, 35: 411-418.
- Johnson J.A. y Whitney N.J. 1992. Isolation of fungal endophytes from black spruce (*Picea mariana*) dormant buds and needles from New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Botany*, 70: 1754-1757.
- Jorgensen R.A. y Cluster P.D. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75: 1238-1247.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. 2002. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Segunda edición. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Jumpponen A. y Trappe J.M. 1998. Dark Septate Endophytes: A Review of Facultative Biotrophic Root-Colonizing Fungi. *New Phytologist*, 140: 295-310.

- Kale S., Bennett J.W. 1992. En: *Handbook of Applied Mycology* (eds. Bhatnagar D., Lillehoj E.B., Arora D.K.). Volumen 5. Marcel Dekker, Nueva York.
- Kedera C.J., Leslie J.F., Laflin L.E. 1994. Genetic Diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in Individual Maize Stalks. *Phytopathology*, 84: 603-607.
- Kharwar R.N., Verma V.C., Strobel G., Ezra D. 2008. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Current Science*, 95: 228-233.
- Kim H.Y., Choi G.J., Lee H.B., Lee S.W., Kim H.K., Jang K.S., Son S.W., Lee S.O., Cho K.Y., Sung N.D., Kim J.C. 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 332-337.
- Kingsbury J.M. 1964. *Poisonous Plants of the United States and Canada*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey.
- Kiss L. y Nakasone K.K. 1998. Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. *Current Genetics*, 33: 362-367.
- Kowalchuk G.A., Gerards S., Woldendorp J.A. 1997. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3858-3864.
- Krebs C.J. 1989. *Ecological methodology*. Harper Collins, Nueva York.
- Kumar D.D.S. y Hyde K.D. 2004. Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17: 69-90.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. En: *Briefings in Bioinformatics*. Volumen 5. Oxford University Press, USA. Páginas 150-163.
- Laessøe T. y Lodge D.J. 1994. Three host-specific *Xylaria* species. *Mycologia*, 86: 436-446.
- Lamas S., Michel T., Brenner B.M., Marsden P.A. 1991. *American journal of physiology*, 261: 634-647.

- Lane G.A., Christensen M.J., Miles C.O. 2000. Coevolution of fungal endophytes with grasses: the significance of secondary metabolites. En: Microbial endophytes (eds. Bacon C.W. y White J.F. Jr.). CRC Press.
- Large E.C. 1940. The Advance of the Fungi, Vol. 7. Nueva York: Dover.
- Lee S.M. y Chao A. 1994. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. *Biometrics*, 50: 88-97.
- Leslie J.F. y Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Capítulo 13. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Li W.C., Zhou J., Guo S.Y., Guo L.D. 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity*, 25: 69-80.
- Liu H., Heckman J.R., Murphy J.A. 1996. Screening fine fescues for aluminum tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, 19: 677–688.
- Liu C.H., Zou W.X., Lu H., Tan R.X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, 88: 277-282.
- Lodge D.J., Fisher P.J., Sutton B.C. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*, 88: 733–738.
- Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kostecki M., Golinski P., Ritieni A., Chelkowski J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3084-3088.
- López L.V. y Hans Börje J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad*, 6: 12 – 15.
- Ludwig J.A. y Reynolds J.F. 1988. Statistical ecology: a primer on methods and computing. John Wiley and Sons. Nueva York, USA.
- Lutzoni F., Kauff F., Cox C.J., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D., James T.Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold A.E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G., Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R.C., Hosaka K., Lim Y., Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J.,

- Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*, 91: 1446-1480.
- Lyons P.C., Plattner R.D., Bacon C.W. 1986. Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science*, 232: 487–89.
- Ma L.J., Catramis C.M., Rogers S.O., Starmer W.T. 1997. Isolation and characterisation of fungi entrapped in glacial ice. *Inoculum*, 48: 23-24.
- Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Mendgen, K., López-Llorca, L.V. 2008. Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 600-609.
- Magurran A.E. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Maidak B.L., Olsen G.J., Larsen N., Overbeek R., McCaughey M.J., Woese C.R. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, 25: 109-110.
- Malinowski D.P. y Belesky D.P. 1999. Tall fescue aluminum tolerance is affected by *Neotyphodium coenophialum* endophyte. *Journal of Plant Nutrition*, 22: 1335–1349.
- Malinowski D.P. y Belesky D.P. 2000. Adaptations of endophyte-infected coolseason grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*, 40: 923–40.
- Mandyam K. y Jumpponen A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53: 173-189.
- Mantle P.G. 1991. Miscellaneous toxigenic fungi. En: *Mycotoxins and Animal Foods* (eds. Smith JE, Henderson RS). CRC Press, Boca Ratón. Páginas 141-152.
- Márquez L.M., Redman R.S., Rodríguez R.J., Roossinck M.J. 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, 315: 513-515.
- Mathre D.E. 1982. *Compendium of barley diseases*. 2ª edición. American Phytopathological Society Press, USA.
- Miller J.D. 1992. Fungi as contaminant of indoor air. *Atmospheric Environment*, 26: 2163-2172.

- Miller J.D, Haisley P.D., Reinhardt J.H. 2000. Air sampling result in relation to extend of fungal colonization of building materials in some water-damaged buildings. *Indoor Air*, 10: 146-151.
- Monnet F., Vaillant N., Vernay P., Coudret A., Sallanon H., Hitmi A.. 2001. Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 158. 1137–1144.
- Moon C.D., Scott B., Schardl C.L., Christensen M.J. 2000. Evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia*, 92: 1103–1118.
- Moss M.O. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. En: *Mycotoxins and Animal Foods* (eds. Smith JF, Henderson RS). CRC Press, Boca Ratón. Páginas 37-56.
- Morakotkarn D., Kawasaki H., Seki T. 2006. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 266: 10-19.
- Moreno C.E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. CYTED, ORCYT/UNESCO y SEA. Zaragoza, España.
- Moreno C.E. y Halfpeter G. 2000. Assessing the completeness of bat biodiversity inventories using species accumulation curves. *Journal of Applied Ecology*, 37: 149–158.
- Mostert L., Crous P.W., Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*, 54: 46-58.
- Muenschner W.C. 1939. *Poisonous plants of the United States*. McMillan, Nueva York.
- Müller M.M., Valjakka R., Suokko A., Hantula A. 2001. Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology*, 10: 1801-1810.
- Murali T.S., Suryanarayanan T.S., Venkatesan G. 2007. Fungal endophyte communities in two tropical forests of southern India: diversity and host affiliation. *Mycological Progress*, 6: 191-199.
- Nsabimana J.M., Moutschen M., Thiry E., Meurens F. 2008. Human infection with simian herpes B virus in Africa. *Sante*, 18: 3-8.

- Neill J.C. 1940. The endophyte of ryegrass (*Lolium perenne*). NZ J. Sci. Technol., Ser. A, 21: 280-291.
- Neill J.C. 1941. The endophytes of *Lolium* and *Festuca*. NZ J. Sci. Technol., Ser. A, 23: 185- 193.
- Nestler A. 1898. Ueber einen in der Frucht von *Lolium temulentum* L., vorkommen den Pilz. Ber. Dtseh. Bot. Ges., 16: 207.
- Neubauer H. y Remer C. 1902. Über die von A. Vogl entdeckte Pilzschicht in *Lolium* Früchten. Zentralbl. Bakteriologie, II, 9: 652-653.
- Neubert K., Mendgen K., Brinkmann H., Wirsel S.G.R. 2006. Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. Applied and Environmental Microbiology, 72: 1118-1128.
- O'Brien H.E., Parrent J.L., Jackson J.A., Moncalvo J.M., Vilgalys R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 71: 5544-5550.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicari*). Current Genetics, 22: 213-220.
- Panaccione D.G. y Schardl C.L. 2003. Molecular genetics of ergot alkaloid biosynthesis. En: The Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts (eds. Bacon C., Hywel-Jones N., Spatafora J., White J.F. Jr.). Marcel-Dekker, Nueva York. Páginas 399-424.
- Park J.H., Choi G.J., Lee H.B., Kim K.M., Jung H.S., Lee S.W., Jang K.S., Cho K.Y. 2005. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. Journal of Microbiology and Biotechnology, 15: 112-117.
- Paterson A.H., Lin Y., Li Z., Schertz K.F., Doebley J.F., Pinson S.R.M., Liu S., Stansel J.W., Irvine J.E. 1995. Convergent Domestication of Cereal Crops by Independent Mutations at Corresponding Genetic Loci. Science, 269: 1714-1718.
- Pearson E.S. 1939. 'Student' as Statistician. Biometrika, 30: 210-250.

- Pearson W.R. 1990. Rapid and Sensitive Sequence Comparison with PASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, 183: 63-98.
- Petrini O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. En: *Microbiology of the Phyllosphere* (eds. Fokkema NJ, van den Huevel J). Cambridge University Press, Cambridge. Páginas 175–187.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. En: *Microbial Ecology of Leaves* (eds. Andrews J.H., Hirano S.S.). Springer-Verlag, Nueva York. Páginas 179–197.
- Petrini O., Stone J., Carroll F.E. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, 60: 789-796.
- Petrini O. y Fisher P.J. 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycological Research*, 94: 1077- 1080.
- Photita W., Lumyong S., Lumyong P., McKenzie E.H.C., Hyde K.D. 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Diversity*, 16: 131-140.
- Pinnoi A., Lumyong S., Hyde K.D., Jones E.B.G. 2006. Biodiversity of fungi on the palm *Eleiodoxa conferta* in Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. *Fungal Diversity*, 22: 205-218.
- Pitt J.I. 1997. Toxigenic *Penicillium* species. En: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers* (eds. Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J.). ASM Press, Washington. Pp. 406-418.
- Polishook J.D., Bills G.F., Lodge D.J. 1996. Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 284-289.
- Pontón J., Moragues M.D., Gené J., Guarno J., Quindós G. 2002. Hongos y Actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, 22-23 pp. <http://hongosalergenicos.reviberoammicol.com/>.
- Porrás-Alfaro A., Herrera J., Sinsabaugh R.L., Odenbach K.J., Lowrey T., Natvig D.O. 2008. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2805–2813.
- Promptutha I., Lumyong S., Dhanasekaran V., McKenzie E.H.C., Hyde K.D., Jeewon R. 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53: 579-590.

- Quesada-Moraga E., Carrasco-Díaz J.A., Santiago-Álvarez C. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 130: 442 – 452.
- Ranghoo V.M., Hyde K.D., Liew E.C.Y., Spatafora J.W. 1999. Family placement of *Ascotaiwania* and *Ascolacicola* based on DNA sequences from the large subunit rRNA gene. *Fungal Diversity*, 2: 159-168.
- Raviraja N.S. 2005. Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range, Western Ghats of India. *Journal of Basic Microbiology*, 45: 230–235.
- Redlin S.C. y Carris L.M. 1996 *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution*. APS Press
- Redman R.S., Dunigan D.D. Rodriguez R.J. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologist*, 151: 705-716.
- Redman R.S., Sheehan K.B., Scout R.G., Rodriguez R.J., Henson J.M. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298: 1581.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel .G., Sydenham E.W., Shepard G.S., van Schalkwyk D.J. 1992. *Fusarium moniliforme* and *Fumosins* in Corn in Relation to Human Esophageal Cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82: 353-357.
- Rivera-Varas V.V, Freeman T.A., Gusmestad N.C., Secor G.A. 2007. Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. *Phytopathology*, 97: 1331-1337.
- Rodrigues K.F. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86: 376– 385.
- Rodrigues, K.F. 1996. Fungal endophytes of palms. En: *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants* (eds. Redlin, S.C. y Carris, C.M.). American Phytopathological Society, St. Paul. Páginas 121-132.
- Rodrigues K. F. y Samuels G.J. 1999. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, 39: 131–135.

- Rodriguez R.J. y Redman R.S. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1109-1114.
- Rollo F., Sassaroli S., Ubaldi M. 1995. Molecular phylogeny of the fungi of the Iceman's grass clothing. *Current Genetics*, 28: 289-297.
- Rowan N.J., Johnstone C.M., McLean R.C., Anderson J.G., Clarke J.A. 1999. Prediction of toxigenic fungal growth in buildings by using a novel modelling system. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4814-4821.
- Rudgers J.A., Holah J., Orr S.P., Clay K. 2007. Forest succession suppressed by an introduced plant-fungal symbiosis. *Ecology*, 88: 18-25.
- Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M., Sullivan T.J. 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319-343.
- Saiton N. y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sampson K. 1933. The systemic infection of grasses by *Epichloë typhina* (Pers) Tul. *Transactions of the British Mycological Society*, 18: 30-47.
- Sampson K. 1935. The presence and absence of an endophytic fungus in *Lolium temulentum* and *L. perenne*. *Transactions of the British Mycological Society*, 19: 337-343.
- Sánchez-Márquez S., Bills G.F., Zabalgogezcoa I. 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*, 27: 171-195.
- Schardl C.L., Leuchtmann A., Tsai H.F., Collett M.A., Watt D.M., Scott D.B. 1994. Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloë typhina*. *Genetics*, 136: 1307-1317.
- Schardl C.L., Leuchtmann A., Spiering M.J. 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 315-340.
- Schardl C.L., Leuchtmann A., McDonald B. 2007. Relationships of *Epichloë typhina* isolates from different host grasses. En: *Proceedings of the 6th International*

- Symposium on Fungal Endophytes of Grasses* (eds. Popay A.J., Thom E.R.). Christchurch, New Zealand: New Zealand Grassland Association. Páginas 451–455.
- Schulz B. y Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661-686.
- Schulz B., Guske S., Dammann U., Boyle C. 1998. Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis*, 25: 213-227.
- Schulz B., Wanke U., Draeger S., Aust H.J. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 97: 1447-1450.
- Scott, P.M. 2007. Analysis of ergot alkaloids—a review. *Mycotoxin Research*, 3: 113-121.
- Scott, P.M., Lombaert, G.A., Pellaers, P., Bacler, S., Lappi, J. 1992. Ergot alkaloids in grain foods sold in Canada. *Journal of AOAC International*, 75: 773-779.
- Seena S. y Sridar K.R. 2004. Endophytic fungal diversity of two sand dune wild legumes from the southwest coast of India. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1015-1021.
- Shamoun S.F. y Sieber T.N. 1993. Isozyme and protein patterns of endophytic and disease syndrome associated isolates of *Melanconium apiocarpum* and *Melanconium marginale* collected from alder. *Mycotaxon*, 49: 151-166.
- Shannon C.E. 1948. A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27: 379-423; 623-656.
- Sharples J.M., Chambers S.M., Meharg A.A., Cairney J.W.G. 2000. Genetic Diversity of Root-Associated Fungal Endophytes from *Calluna vulgaris* at Contrasting Field Sites. *New Phytologist*, 148: 153-162.
- Shelby R.A. y Dalrymple L.W. 1993. Long-term changes of endophyte infection in tall fescue stands. *Grass and Forage Science*, 48: 356-361.
- Simon L., Lalonde M., Bruns T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 291-295.
- Smith E.P., van Belle G: 1984. Nonparametric estimation of species richness. *Biometrics*, 40: 119-129.

- Smith J.E. y Henderson R.S. 1991. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Ratón.
- Soberón J. y Llorente J. 1993. The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conservation Biology*, 7: 480–488.
- Soderstrom T.R. y Calderón C.E. 1971. Insect pollination in tropical rain forest grasses. *Biotropica*, 3: 1-16.
- Southwood T.R.E. 1987. The concept and nature of the community. En: *Organization of communities past and present* (eds. A.G. Hildrew, C.R. Townsend, J.H.R. Gee, P.S. Giller). Blackwell Scientific Publications.
- Stierle A., Strobel G., Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260: 214-216.
- Stone J.K., Polishook J.D., White J.F. Jr. 2004. Endophytic fungi. En: *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods* (eds. Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S.). Elsevier Academic Press, USA. Páginas 241-270.
- Stone J.K. 2006. Ecological roles of endophytes in forest ecosystems. *Phytopathology*, 96: 136.
- Strobel G.A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 315-333.
- Suryanarayanan T.S. y Vijaikrishna D. 2001. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity*, 8: 155-161.
- Suryanarayanan T.S., Kumaresan V., Johnson J.A. 1998. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 1003–1006.
- Suryanarayanan T.S., Murali T.S., Venkatesan G. 2002. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany/Revue Canadienne de Botanique*, 80: 818-826.
- Suryanarayanan T.S., Venkatesan G., Murali T.S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees. Diversity and distribution patterns. *Current Science*, 85: 489-493.

- Suryanarayanan T.S., Wittlinger S.K., Faeth S.H. 2005. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research*, 109: 635-639.
- Sutherland B.L., Hume D.E., Tapper B.A. 1999. Allelopathic effects of endophyte infected perennial ryegrass extracts on white clover seedlings. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42: 19-26.
- Sutton B.C. 1998. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. CABI Publishing. Oxon, Reino Unido.
- Tadych M., Bergen M., Dugan F.M., White J.F. Jr. 2007. Evaluation of the potential role of water in spread of conidia of the *Neotyphodium* endophyte of *Poa annua*. *Mycological Research*, 111: 466-472.
- Takamatsu S. 1998. PCR applications in fungal phylogeny. En: *Applications of PCR in mycology* (eds. Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander R.P.). CAB International, 125-152. Wallingford, Reino Unido.
- Taylor J.E., Hyde K.D., Jones E.B.G. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*, 142: 335-346.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21-32.
- Thomas M.D. y Buddenhagen I.W. 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia*, 72: 883-887.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Timper P., Gates R.N., Bouton J.H. 2005. Response of *Pratylenchus* spp. in tall fescue infected with different strains of the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Nematology*, 7: 105-110.
- Tutin G. T., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M. 1980. *Flora Europaea*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Umali T.E., Quimio T.H., Hyde K.D. 1999. Endophytic fungi in leaves of *Bambusa tuldoidea*. Fungal Science, 14: 11-18.
- Unterseher M., Schnittler M., Dormann C., Sickert A. 2008. Application of species richness estimators for the assessment of fungal diversity. FEMS Microbiology Letters, 282: 205-213.
- Van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglou P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature, 396: 69-72.
- Vázquez de Aldana B.R., Zabalgogezcoa I., García-Ciudad A., García-Criado B. 2007. Fungal alkaloids in populations of endophyte-infected *Festuca rubra* subsp. *pruinosa*. Grass and Forage Science, 62: 364-371.
- Vogl A. 1898. Mehl und die anderen Mehlprodukte der Cerealien und Leguminosen. Z. Nahrungsmittel Unters. Hyg. Warenkunde, 12: 25-29.
- Vogler D.R. y Bruns T.D. 1998. Phylogenetic relationships among the pine stem rust fungi (*Cronartium* and *Peridermium* spp.). Mycologia, 90: 244-257.
- Von Arx J.A. 1981. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. 2ª edición. Shiva Offset Press, Dehra Dun, India.
- Vu T., Hauschild R., Sikora R.A. 2006. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. Nematology, 8: 847-852.
- Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Hückelhoven R., Neumann C., von Wettstein D., Franken P., Kogel K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 13386-13391.
- Wang F.W., Jiao R.H., Cheng A.B., Tan S.H., Song Y.C. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23:79-83.
- Watson R.N., Prestidge R.A., Ball O.J.P. 1993. Suppression of white clover by ryegrass infected with *Acremonium* endophyte. En: *Proceedings of the 2nd International*

- Symposium on Acremonium/Grass Interactions* (eds. Hume, D.E.; Latch, G.C.M.; Easton, H.S.). Páginas 218-221
- Webster J. 1956. Succession of fungi on decaying cocksfoot culms. Part I. *Journal of Ecology*, 44: 517-544.
- Webster J. 1957. Succession of fungi on decaying cocksfoot culms. Part II. *Journal of Ecology*, 45: 1-29.
- West C.P., Izekor E., Oosterhuis D.M., Robbins R.T. 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. *Plant Soil*, 112: 3-6.
- West H.M. 1996. Influence of arbuscular mycorrhizal infection on competition between *Holcus lanatus* and *Dactylis glomerata*. *The Journal of Ecology*, 84: 429-438
- Whalley A.J.S. y Edwards R.L. 1987. *Xylariaceous fungi: Use of Secondary Metabolites*. En: *Evolutionary Biology of the Fungi* (eds. Rayner ADM, Brsier CM, Moore D). Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra. Páginas 423-434.
- White, J.F. Jr. 1988. Endophyte-host associations in forage grasses. XI. A proposal concerning origin and evolution. *Mycologia*, 80: 442-446.
- White I.R. y Backhouse D. 2007. Comparison of fungal endophyte communities in the invasive panicoid grass *Hyparrhenia hirta* and the native grass *Botriochloa macra*. *Australian Journal of Botany*, 55: 178-185.
- White T.J, Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols. A guide to methods and applications* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfland, J.J. Sninsky, T.J. White). Academic Press, USA. Páginas 315-322.
- Whittaker R.J., Willis K.J., Field R. 2001. Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography*, 28: 453-470.
- Wiese M.V. 1987. *Compendium of wheat diseases*. 2nd ed. American Phytopathological Society Press, USA.
- Wilkinson H.H., Siegel M.R., Blankenship J.D., Mallory A.C., Bush L.P., C.L. Schardl. 2000. Contribution of Fungal Loline Alkaloids to Protection from Aphids in a Grass-Endophyte Mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 1027-1033.

- Willott S.J. 2001. Species accumulation curves and the measure of sampling effort. *Journal of Applied Ecology*, 38: 485–487.
- Wirsel S.G.R., Leibinger W., Ernst M., Mendgen K. 2001. Genetic diversity of fungi commonly associated with common reed. *New Phytologist*, 149: 589-598.
- Whittaker R.H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, 21: 213-251.
- Wong M.K.M. y Hyde K.D. 2001. Diversity of fungi on six species of *Graminae* and one species of *Cyperaceae* in Hong Kong. *Mycological Research*, 105: 1485-1491.
- Zabalgogezcoa I. 2008. Review. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 138-146.
- Zabalgogezcoa I. y Bony S. 2005. *Neotyphodium* research and application in Europe. En: *Neotyphodium in Cool-Season Grasses* (eds. Roberts C.A., West C.P., Spiers D.E.), pp. 23–33. Oxford, Reino Unido. Blackwell Publishing.
- Zabalgogezcoa I. y Vázquez de Aldana B.R. 2007. Potencial del hongo endofítico *Epichloë festucae* para la mejora del césped. *Innovación y tecnología agroalimentaria*, 2: 145-157.
- Zabalgogezcoa I., García Ciudad A., García Criado B. 1998. *Neotyphodium coenophialum* en semillas de variedades forrajeras de *Festuca arundinacea*. *Investigación Agraria. Producción y Protección de Vegetales*, 13: 1-2.
- Zabalgogezcoa I., Vázquez de Aldana B.R., García Criado B., García Ciudad A. 2001. The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science*, 54: 91–95.
- Zabalgogezcoa I., Vázquez de Aldana B.R., García Ciudad A., García Criado B. 2003. Fungal endophytes in grasses from semi-arid permanent grasslands of western Spain. *Grass and Forage Science*, 58: 94-97.
- Zabalgogezcoa I., García Ciudad A., Vázquez de Aldana B.R., García Criado B. 2006. Effects of the infection by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in the growth and nutrient content of *Festuca rubra*. *European Journal of Agronomy*, 24: 374–384.

- Zabalgogezcoa, I., Ciudad A.G., Leuchtmann A., Vázquez de Aldana B.R., Criado B.G. 2008a. Effects of choke disease in the grass *Brachypodium phoenicoides*. *Plant Pathology*, 57: 467-472.
- Zabalgogezcoa I., Oleaga A., Pérez R. 2008b. Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: *Argasidae*). *Veterinary Parasitology*, 158: 336-343.
- Zak J.C. y Willig M.R. 2004. Fungal biodiversity patterns. En: *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods* (eds. G.M Mueller., G.F. Bills, M.S. Foster). Elsevier Academic Press, USA. Páginas 59-75.
- Zervakis G.I., Moncalvo J., Vilgalys R. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology*, 150: 715-726.
- Zhang W.P., Wendel J.F., Clark L.G. 1997. Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (*Poaceae*: *Bambusoideae*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 8: 205-217.

PUBLICACIONES

The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*

Salud Sánchez Márquez¹, Gerald F. Bills² and Iñigo Zabalgoeazcoa^{1*}

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain

²Centro de Investigación Básica de España, Merck, Sharp & Dohme, Josefa Valcárcel 38, 28027 Madrid, Spain

Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. and Zabalgoeazcoa, I. (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Diversity 27: 171-195.

Fungal endophytes were isolated from asymptomatic and symptomatic plants of *Dactylis glomerata* sampled in different ecosystems in Spain. Fungi were identified using morphological, as well as molecular methods based on internal transcribed spacer (ITS) and ribosomal DNA sequencing. Molecular data provided a framework for identification and assessing the phylogenetic position of isolates. One hundred and nine different fungal species were identified. Eighteen of these species were potentially unknown. The endophytic assemblage consists of grass-specific, as well as generalist species, and is quite different from those described for perennial woody species. Species richness curves showed that the survey discovered most species commonly infecting this grass, but the number of sporadic infections of singleton species continued to increase with more sampling effort. A large endophytic assemblage consisting of fungi with diverse ecological roles, and potentially unknown species, was found in a small herbaceous plant.

Key words: biodiversity, endophytes, rDNA, ITS

Introduction

Endophytic fungi are those that live in the interior of apparently healthy and asymptomatic hosts. Fungi fitting this description appear to be ubiquitous; indeed, no study has yet shown the existence of a plant species without endophytes (Promputtha *et al.*, 2007). High species diversity is another characteristic of endophytic mycobiota. It is quite common for endophyte surveys to find assemblages consisting of more than 30 fungal species per host plant species (Stone *et al.*, 2004; Ganley *et al.*, 2006; Kauhanen *et al.*, 2006).

Culture-dependent assessments of endophytic fungi are based on isolations from surface-sterilized plant tissue samples, which are subsequently plated on culture media (Bills, 1996; Stone *et al.*, 2004; Devarajan and Suryanarayanan, 2006). Fungi that emerge from these samples can be identified

*Corresponding author: I. Zabalgoeazcoa; e-mail: izabalgo@usal.es

by means of phenotypic (morphological) or genotypic (molecular) characters. Since the sequencing of ribosomal DNA and internal transcribed spacers (ITS) was applied to fungal taxonomy, improved taxonomic information has been accumulated from sterile isolates obtained in endophyte surveys (Guo *et al.*, 2000; Wirsal *et al.*, 2001; Promputtha *et al.*, 2005; Crozier *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2007).

Certain vertically-transmitted endophytes can have a beneficial influence on their plant hosts. Some of the best known organisms in this category are the *Epichloë/Neotyphodium* systemic endophytes, whose grass hosts contain fungal alkaloids toxic to herbivores, and have shown advantages in certain situations of biotic and abiotic stress (Clay and Schardl, 2002; Wang *et al.*, 2005). Other plant-endophyte associations result in improved plant adaptation to salt and thermal stress, increased biomass, or resistance to pathogen damage (Redman *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Waller *et al.*, 2005). As a result, fungal endophytes could be very useful for plant improvement. In fact, some cultivars of forage and turf grasses artificially infected by select endophytes are commercially available (Bouton and Easton, 2005). In addition, the production of antimicrobial and toxic secondary metabolites is relatively common in this group of fungi, and their potential as a source of drugs may also be important (Strobel, 2002; Wang *et al.*, 2007). At the other extreme of the endophyte spectrum exist species that behave as latent and weak pathogens (Photita *et al.*, 2004; Gonthier *et al.*, 2006).

This work describes a wide range of endophytic species associated with *Dactylis glomerata*, a perennial grass native to the temperate zones of Europe, Asia, and North Africa. Commercial cultivars of this grass are used for forage production, usually in mixtures with other plants like ryegrass, alfalfa, or clovers. *Dactylis* is a monospecific genus, but several subspecies, some of them differing in ploidy level have been described (Lumaret, 1988). In Spain, wild plants of *D. glomerata* are common in many ecosystems, in dry areas of the central part of the country, as well as in the humid north.

The objectives of this study were to identify the endophytic mycobiota of *Dactylis glomerata* from different habitats, and to determine if potential pathogens of the plant host as well as of cereal crops behave as endophytes. Also, we wanted to compare the assemblage of endophytes of this grass with those found in other plant groups, like woody perennials.

Materials and methods

Sample collection

The collected plants of *Dactylis glomerata* lacked obvious disease symptoms such as chlorosis, leaf spots, or other types of pathogen-induced

lesions. Plants were sampled at ten locations in the province of Salamanca, one location in the province of Ávila, one location in the province of Cáceres, and two locations in the province of La Coruña (Table 1). Salamanca, Ávila, and Cáceres are located in central-western Spain, and their climate is of Mediterranean type with a continental trend (cold winters and dry warm summers). La Coruña, located in northern Spain, has a milder humid Atlantic climate. In Salamanca, plants were obtained from different habitats, such as river banks, semiarid grasslands, or sulphurous water springs (Table 1). All of these locations represent a set of ecologically different habitats. The number of plants sampled varied among locations, and at each location a distance of more than 10 meters was left between sampled plants.

In addition to the asymptomatic plants, in Montemayor del Río (Salamanca), 11 plants showing disease symptoms, e.g., leafspots or other types of leaf lesions, were collected in order to isolate pathogens from the diseased tissue. Dry culms were also collected at two locations in Salamanca: Montemayor del Río (14 plants), and Muñovela (5 plants). Fungal isolates were obtained from fructifications in these culms.

Plants were sampled during the summer and fall of 2003 and throughout the year in 2004 and 2005. Whole plants were dug up in the field and transported to the laboratory, where they were processed for the isolation of fungi.

Isolation of fungi

To isolate endophytes from the plants, small leaf pieces, measuring about 5 mm in length were washed in tubes containing a solution of 20% commercial bleach (1% active chlorine) for 10 minutes. The treatment was followed by a rinse in sterile water, and plating on potato dextrose agar (PDA) containing chloramphenicol (200 mg/l). Root fragments were surface-disinfected by means of a 5 minute rinse with ethanol, followed by treatment with a 1% active chlorine solution for 15 minutes, 2 minutes in ethanol, and a final rinse in sterile water (Bills, 1996). For each one of the 120 sampled plants, two plates, each containing about 15 leaf pieces, were prepared and kept in the dark at room temperature (22-26°C). Stem fragments were also prepared as above described, but only from 7 plants. Two similar plates of root fragments were prepared from 82 plants. As mycelium emerged from plant tissues into the agar, mycelial fragments were transferred to new PDA plates. These isolates were maintained under natural light at room temperature.

In plants with disease symptoms, small pieces of tissue were cut from the margins of leaf lesions, and plated on PDA after surface disinfection. Fungal

Table 1. Locations and habitat types where asymptomatic plants were sampled, showing the number of isolates obtained, and of species identified at each location.

Location ^a	Type of habitat	Number of plants	Number of isolates	Isolates per plant	Number of species
Beco, Cedeira, Co	Coastal meadow	15	50	3.33	35
Calvarrasa de Arriba, Sa	River bank	8	47	5.88	34
Casas del Conde, Sa	River bank	1	1	1	1
Cristo de Cabrera, Sa	Road ditch	9	18	2	14
El Cabaco, Sa	<i>Quercus pyrenaica</i> woodland	13	29	2.23	26
Faro, Cedeira, Co	Coastal meadow	15	35	2.33	21
Fuente Roldán, Sa	Sulphurous spring	2	11	5.50	10
Los Montalvos, Sa	Road ditch	7	9	1.29	8
Montemayor del Río, Sa	Sheep track	3	6	2	4
Muñovela, Sa	<i>Quercus ilex</i> grassland	6	34	5.67	19
Puente Mocho, Sa	River bank	12	36	3	21
Sagos, Sa	<i>Quercus ilex</i> grassland	2	5	2.50	4
Valvellidos, Ca	Meadow	18	25	1.39	16
Villafranca de la Sierra, Av	River bank	9	10	1.11	7

Note: ^aProvinces of Co: La Coruña, Sa: Salamanca, Ca: Cáceres, Av: Ávila.

samples from fructifications in dry culms were obtained using needles, or excising fructifications, cleaning them on water agar, and plating.

In order to induce sporulation in isolates not producing spores in the PDA medium, fungi were cultured in three other media: malt extract agar, water agar, and water agar containing sterilized pieces of leaves of *Dactylis glomerata*. These growth media also contained 200 mg/l of chloramphenicol.

To test whether the disinfection methods were effective in eliminating surface fungi, imprints of leaf fragments were made by pressing them against the surface of some PDA plates, then these plates were incubated without plant parts. The plates were periodically observed to determine if fungi emerged from the prints (Schulz *et al.*, 1998).

DNA amplification and sequencing

Because many isolates failed to sporulate on any growth medium, identifications were approximated by means of the nucleotide sequence of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region. DNA was extracted from small mycelial fragments scraped from the surface of culture plates using a commercial kit

(RedExtract-N-Amp Plant PCR, Sigma Aldrich). One volume of phenol saturated with 10 mM Tris-HCl pH 8 was added to the DNA extract obtained with the kit, and the aqueous phase was recovered after centrifugation at $13,000 \times g$ for 10 minutes. This phase was reextracted with one volume of chloroform, centrifuged at $13,000 \times g$ for 5 minutes, and the aqueous extract containing DNA was used for PCR amplification. The ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region was amplified in a PCR which included 2 μ l of DNA extract and primers ITS4 and ITS5 (White *et al.*, 1990). Amplification conditions were: 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 54°C for 1 min, and 72°C for 1 min; after these cycles the reaction was kept at 72°C for 10 minutes. PCR amplicons were purified by filtration (Montage PCR, Millipore), and sequenced in a 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosciences). Only one strand of the PCR amplicon was sequenced. The sequencing reaction was started at the 5' end of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region, using primer ITS4. The quality of the sequences obtained was analyzed by means of the sequencing reaction chromatograms, visualized with Chromas 1.45 software (Technelysium, Australia). Only sequences whose chromatograms showed discrete peaks, and no ambiguous sections were used.

For a subset of 12 isolates, both strands of the ITS amplicons were sequenced using primers ITS4 and ITS5 (Table 2). These complete ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequences were used to analyze the reliability of the taxonomic information obtained with the corresponding partial one-sided sequences.

Nucleotide sequences were trimmed at the 5' end of the ITS1 region. In most sequences the beginning of this region was identified by means of the conserved sequence GATCAT, which is found at the end of the 18S rRNA gene. The 3' end of each sequence was trimmed at places where the sequence chromatogram showed that the sequence quality was good, and not ambiguous.

Molecular taxonomy

To find ITS sequences similar to the ones obtained from the *Dactylis* isolates, the FASTA algorithms (Pearson, 1990) were used to interrogate the EMBL/Genbank database of fungal nucleotide sequences.

To visualize the diverse fungal taxa identified by means of molecular characters, a sequence similarity dendrogram was made with the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 nucleotide sequences of the isolates. Isolate sequences were aligned using the program ClustalX (Thompson *et al.* 1997) with the default settings, and the dendrogram was made with MEGA 3.1 using the neighbor-

Table 2. Value of the partial sequences lacking part of the 3' end of ITS2 region for isolate identification.

Isolate accession number	Partial sequence size ^a (nt)	Complete sequence Size ^b (nt)	FASTA ID obtained with partial sequence	E ^c value	FASTA ID obtained with complete sequence	E value
AM262408	353	472	<i>Beauveria bassiana</i>	1.9e-71	<i>Beauveria bassiana</i>	3.2e-70
AM262444	503	594	<i>Mortierella alpina</i>	3.8e-84	<i>Mortierella alpina</i>	2.3e-90
AM262418	468	482	<i>Embellisia eureka</i>	5.8e-66	<i>Embellisia eureka</i>	4.8e-72
AM262430	520	535	<i>Helgardia anguioides</i>	2.5e-66	<i>Helgardia anguioides</i>	2.3e-77
AM262441	452	499	<i>Rhodotorula minuta</i>	1.3e-58	<i>Rhodotorula minuta</i>	6.4e-69
AM262371	479	517	<i>Valsa ceratosperma</i>	6.3e-53	<i>Valsa ceratosperma</i>	3.1e-67
AM262439	483	604	<i>Mycena murina</i>	5.5e-76	<i>Mycena murina</i>	9.8e-93
AM262979	535	547	<i>Ustilago williamsii</i>	1.9e-57	<i>Ustilago williamsii</i>	1.7e-57
AM262403	452	500	<i>Epacrid</i> root endophyte	2.4e-45	<i>Epacrid</i> root endophyte	3.5e-52
AM262343	415	507	<i>Talaromyces ohiensis</i>	5.9e-36	<i>Talaromyces ohiensis</i>	2.9e-41
AM262424	457	466	<i>Eurotium amstelodami</i>	1.7e-59	<i>Eurotium amstelodami</i>	6.8e-61
AM262431	479	515	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	6e-53	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	1.2e-54

Note: ^aPartial sequences were obtained with sequencing reactions primed with primer ITS4 (White *et al.*, 1990), which produces sequences with characteristics like those shown in Table 5. ^bComplete sequences were obtained by sequencing with primers ITS4 and ITS5 both strands of the replicon containing the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region. ^cNumber of database matches as good as the observed one which could occur by chance.

joining method with Kimura 2-parameter distances (Kumar *et al.*, 2004). Groups of sequences at close proximity within the same branch of the dendrogram were individually aligned with ClustalX to determine their percentage of similarity. Because for most fungal species the range of intraspecific variation in ITS sequences is unknown (Taylor *et al.*, 2000), sequences with a similarity greater than 97% were considered to belong to the same species. This distance is an arbitrary number which has been used in other studies (O'Brien *et al.*, 2005; Neubert *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2007).

Quantification of fungal diversity

Species accumulation curves, showing the relationship between the number of plants sampled and the number of fungal species identified, were made by random sampling without replacement of the fungal species data obtained from each plant sample (Colwell and Coddington, 1994). These calculations were made with EstimateS 7.5 software (Colwell, 2005). Species accumulation curves were also plotted with a data set which only contained plural species, represented by more than one isolate, and with a dataset of singleton species, each represented by a single isolate.

To estimate the possible total number of endophytic species which could be associated to *Dactylis glomerata*, the incidence-based coverage estimator (ICE), and the Chao 2 estimator of total species richness were calculated (Chazdon *et al.*, 1998).

Shannon's index of diversity (H') was estimated from the relative abundance of each taxon identified (Zak and Willig, 2004).

Results

Isolation and morphological characteristics of fungi

Fungi did not grow out of plates where leaf imprints were made (Schulz *et al.*, 1998), indicating that the surface sterilization methods efficiently eliminated epiphytes, and the fungal isolates obtained correspond to fungi with an endophytic growth habit. This is an excellent method for testing protocols for isolating endophytes and should be used in all endophyte studies.

From a total of 120 field-sampled plants, approximately 1400 isolates were obtained. An initial visual screening was carried out to avoid selecting several identical isolates from the same plant. As a result, a total of 316 fungal isolates were selected and identified (Tables 1 and 3). On the average, 2.63 species were identified on each plant, and only 13 plants did not yield any

Table 3. Endophytic isolates identified by means of morphological and/or molecular characters, and isolates which could not be identified due to sterility and low homology to known nucleotide sequences, or high homology to sequences of unknown fungi in the EMBL fungi database.

Isolate accession number	Morphological identification	Sequence-based identification ^a	% FASTA identity ^a	Proposed identification	Presence in leaves	Presence in roots
176	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>n.s.</i> ^c	-	<i>Cladosporium</i> sp.	17	3
AM262430	<i>Helgardia</i> sp.	<i>Helgardia</i> sp.	96.95	<i>Helgardia</i> sp.	11	7
AM262390	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium strictum</i>	99.80	<i>Acremonium strictum</i>	17	0
1471	<i>Penicillium</i> sp.	<i>n.s.</i> ^c	-	<i>Penicillium</i> sp.	6	10
1463	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>n.s.</i> ^c	-	<i>Epicoccum</i> sp.	10	4
1365	<i>Podospora</i> sp.	<i>n.s.</i> ^c	-	<i>Podospora</i> sp.	9 ^f	3
1794	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>n.s.</i> ^c	-	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	8 ^f	2
AM262420	<i>Epichloë typhina</i>	<i>Epichloë typhina</i>	100	<i>Epichloë typhina</i>	8	0
AM262425	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	100	<i>Fusarium</i> sp. A	5	3
AM262393	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	100	<i>Alternaria</i> sp.	7	0
AM262400	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	99.60	<i>Chaetomium</i> sp. A	6 ^f	1
AM262435	Sterile mycelium	<i>Lewia infectoria</i>	99.82	<i>Lewia infectoria</i>	5	2
AM262340	<i>Microdochium phragmitis</i>	<i>Microdochium phragmitis</i>	100	<i>Microdochium phragmitis</i>	6	0
AM262407	Sterile mycelium	<i>Coniothyrium cereale</i>	100	<i>Coniothyrium cereale</i>	5	0
AM262414	Sterile mycelium	<i>Drechslera</i> sp.	99.83	<i>Drechslera</i> sp.	2	3
AM262433	Sterile mycelium	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	98.38	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	3	2
AM262426	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium culmorum</i>	100	<i>Fusarium culmorum</i>	3	1
AM262344	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99.04	<i>Penicillium</i> sp. A	1	3
AM262345	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	98.85	<i>Penicillium</i> sp. B	2	2
AM262347	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99.61	<i>Penicillium</i> sp. D	2	2
AM262348	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	100	<i>Penicillium</i> sp. E	2	2
AM262351	Sterile mycelium	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	99.60	<i>Phaeosphaeria</i> sp. A	2	2
AM262405	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Glomerella</i> sp.	97.33	<i>Glomerella</i> sp.	3	0

Table 3. continued. Endophytic isolates identified by means of morphological and/or molecular characters, and isolates which could not be identified due to sterility and low homology to known nucleotide sequences, or high homology to sequences of unknown fungi in the EMBL fungi database.

Isolate accession number	Morphological identification	Sequence-based identification ^a	% FASTA identity ^a	Proposed identification	Presence in leaves	Presence in roots
AM262408	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Cordyceps bassiana</i>	100	<i>Cordyceps bassiana</i>	3	0
AM262416	<i>Drechslera biseptata</i>	<i>Drechslera biseptata</i>	99.82	<i>Drechslera biseptata</i>	3 ^f	0
AM262417	Sterile mycelium	<i>Drechslera dactylidis</i>	99.82	<i>Drechslera dactylidis</i>	2	1
AM262428	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	99.36	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	2
AM262434	Sterile mycelium	<i>Leptosphaeria</i> sp.	99.58	<i>Leptosphaeria</i> sp.	3	0
AM262360	Sterile mycelium	<i>Podospora decipiens</i>	100	<i>Podospora decipiens</i>	3 ^f	0
AM262370	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i>	100	<i>Trichoderma viride</i>	2	1
AM262392	<i>Acremonium</i> sp. B ^b	<i>Nectria mauritiicola</i>	91.37	<i>Acremonium</i> sp. B	2	0
AM262394	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	92.62	<i>Arthrinium</i> sp. A	2	0
AM262395	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	100	<i>Arthrinium</i> sp. B	2	0
AM262410	Sterile mycelium	<i>Cyathicula</i> sp.	97.70	<i>Cyathicula</i> sp.	1 ^f	1
AM262412	Sterile mycelium	<i>Davidiella tassiana</i>	100	<i>Davidiella tassiana</i>	2	0
AM262422	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Eupenicillium</i> sp.	98.43	<i>Eupenicillium</i> sp.	0	2
AM262443	<i>Laetisaria arvalis</i> ^{b, d}	<i>Amauroderma subresinosum</i>	77.15	<i>Laetisaria arvalis</i>	2	0
AM262343	<i>Paecilomyces</i> sp. ^b	<i>Talaromyces ohiensis</i>	94.63	<i>Paecilomyces</i> sp.	2	0
AM262346	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	99.81	<i>Penicillium</i> sp. C	0	2
AM262353	Sterile mycelium	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	98.54	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	2	0
AM262364	<i>Sordaria</i> sp.	<i>Sordaria macrospora</i>	99.81	<i>Sordaria macrospora</i>	0	2
AM262368	Sterile mycelium	<i>Stemphylium solani</i>	99.23	<i>Stemphylium solani</i>	2	0
AM262371	Sterile mycelium	<i>Valsa</i> sp.	95.65	<i>Valsa</i> sp.	2	0
AM262391	<i>Acremonium</i> sp. A ^b	<i>Nectria mauritiicola</i>	89.72	<i>Acremonium</i> sp. A	1	0
1521	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>n.s.</i> ^c	-	<i>Arthrinium</i> sp.	1	0
AM262396	Sterile mycelium	<i>Ascochyta</i> sp.	96.15	<i>Ascochyta</i> sp.	1	0

Table 3. continued. Endophytic isolates identified by means of morphological and/or molecular characters, and isolates which could not be identified due to sterility and low homology to known nucleotide sequences, or high homology to sequences of unknown fungi in the EMBL fungi database.

Isolate accession number	Morphological identification	Sequence-based identification ^a	% FASTA identity ^a	Proposed identification	Presence in leaves	Presence in roots
AM262397	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus terreus</i>	99.18	<i>Aspergillus terreus</i>	0	1
AM262398	<i>Auxarthron compactum</i> ?	<i>Auxarthron conjugatum</i>	99.78	<i>Auxarthron conjugatum</i>	1	0
AM262399	<i>Phialophora</i> -like anamorph	<i>Calycina herbarum</i>	98.64	<i>Calycina herbarum</i>	1	0
AM262401	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	95.10	<i>Chaetomium</i> sp. B	0	1
AM262402	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium funicola</i>	98.65	<i>Chaetomium funicola</i>	1	0
AM262403	<i>Chloridium</i> sp. ^b	<i>Epacrid</i> root endophyte	91.45	<i>Chloridium</i> sp.	1	0
AM262404	Sterile mycelium	<i>Cladosporium oxysporum</i>	100	<i>Cladosporium oxysporum</i>	1	0
AM262406	<i>Coniochaeta</i> sp. ^b	Ascomycete sp.	92.55	<i>Coniochaeta</i> sp.	0	1
AM262409	<i>Libertella</i> anamorph of <i>Creosphaeria sassafras</i>	<i>Creosphaeria sassafras</i>	99.78	<i>Creosphaeria sassafras</i>	1	0
AM262437	Pink yeast	<i>Cryptococcus</i> sp. ^d	99.09	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	0
AM262436	Pink yeast	<i>Cryptococcus paraflavus</i> ^d	99.02	<i>Cryptococcus paraflavus</i>	1	0
AM262445	<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Cunninghamella elegans</i> ^e	99.50	<i>Cunninghamella elegans</i>	0	1
AM262411	<i>Cylindrotrichum</i> sp. ^b	<i>Glomerella cingulata</i>	85.06	<i>Glomerella cingulata</i>		
AM262438	Orange yeast	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	100	<i>Cystofilobasidium macerans</i>	1	0
AM262413	Coelomycete	<i>Discula quercina</i>	100	<i>Discula quercina</i>	1 ^f	0
AM262415	Sterile mycelium	<i>Drechslera andersenii</i>	100	<i>Drechslera andersenii</i>	1	0
AM262418	Sterile mycelium	<i>Embellisia</i> sp.	98.44	<i>Embellisia</i> sp.	1	0
AM262419	<i>Engyodontium album</i>	<i>Engyodontium album</i>	99.43	<i>Engyodontium album</i>	1	0
AM262421	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>	99.80	<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0
AM262423	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Eupenicillium tropicum</i>	99.73	<i>Eupenicillium tropicum</i>	0	1

Table 3. continued. Endophytic isolates identified by means of morphological and/or molecular characters, and isolates which could not be identified due to sterility and low homology to known nucleotide sequences, or high homology to sequences of unknown fungi in the EMBL fungi database.

Isolate accession number	Morphological identification	Sequence-based identification ^a	% FASTA identity ^a	Proposed identification	Presence in leaves	Presence in roots
AM262424	<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>	99.41	<i>Eurotium amstelodami</i>	0	1
AM262427	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium equiseti</i>	100	<i>Fusarium equiseti</i>	0	1
AM262429	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium poae</i>	98.67	<i>Fusarium poae</i>	0	1
AM262431	<i>Hormonema</i> sp. ^b	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	91.15	<i>Hormonema</i> sp.	1 ^f	0
AM262432	Sterile mycelium	<i>Lachnum pygmaeum</i>	97.61	<i>Lachnum pygmaeum</i>	0	1
AM262444	<i>Mortierella alpina</i>	<i>Mortierella alpina</i> ^e	99.35	<i>Mortierella alpina</i>	1	0
AM262439	Basidiomycete	<i>Mycena</i> sp. ^d	95.10	<i>Mycena</i> sp.	0	1
AM490816	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i> sp.	98.43	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	1
AM262341	<i>Nigrospora</i> sp.	Fungal endophyte	96.77	<i>Nigrospora</i> sp.	1	0
AM262342	<i>Oidiodendron</i> sp.	<i>Oidiodendron</i> sp.	99.54	<i>Oidiodendron</i> sp.	0	1
AM262349	Sterile mycelium	<i>Periconia macrospinos</i>	100	<i>Periconia macrospinos</i>	0	1
AM262350	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	99.78	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	1	0
AM262352	Sterile mycelium	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	95.05	<i>Phaeosphaeria</i> sp. B	1	0
AM262354	Sterile mycelium	<i>Phoma</i> sp.	98.93	<i>Phoma</i> sp.	1	0
AM262355	<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma exigua</i>	99.78	<i>Phoma exigua</i>	1	0
AM262356	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	99.38	<i>Phomopsis</i> sp. A	0	1
AM262357	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	96.23	<i>Phomopsis</i> sp. B	0	1
AM262358	Sterile mycelium	<i>Podospira</i> sp.	95.26	<i>Podospira</i> sp.	0	1
AM262359	<i>Podospira</i> sp.	<i>Podospira coprophila</i>	99.80	<i>Podospira coprophila</i>	0	1
AM262361	Sterile mycelium	<i>Podospira tetraspora</i>	99.59	<i>Podospira tetraspora</i>	1	0
AM262362	<i>Pseudoterotium</i> sp.	<i>Pseudoterotium bakeri</i>	100	<i>Pseudoterotium bakeri</i>	0	1
AM262440	Unidentified yeast	<i>Rhodotorula bacarum</i> ^d	99.39	<i>Rhodotorula bacarum</i>	1	0
AM262441	Unidentified yeast	<i>Rhodotorula minuta</i> ^d	99.79	<i>Rhodotorula minuta</i>	1	0

Table 3. continued. Endophytic isolates identified by means of morphological and/or molecular characters, and isolates which could not be identified due to sterility and low homology to known nucleotide sequences, or high homology to sequences of unknown fungi in the EMBL fungi database.

Isolate accession number	Morphological identification	Sequence-based identification ^a	% FASTA identity ^a	Proposed identification	Presence in leaves	Presence in roots
AM262363	<i>Sagenomella</i> sp. ^b	<i>Talaromyces purpureus</i>	85.83	<i>Sagenomella</i> sp.	0	1
AM262367	Sterile mycelium	<i>Stagonospora arenaria</i>	99.50	<i>Stagonospora arenaria</i>	1	0
AM262365	Sterile mycelium	<i>Stagonospora</i> sp.	98.92	<i>Stagonospora</i> sp. A	1	0
AM262366	Sterile mycelium	<i>Stagonospora</i> sp.	95.20	<i>Stagonospora</i> sp. B	1	0
AM262369	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Torrubiella confragosa</i>	99.24	<i>Torrubiella confragosa</i>	1	0
AM262442	Basidiomycete	<i>Trametes versicolor</i> ^d	99.27	<i>Trametes versicolor</i>	1	0
148	<i>Ulocladium</i> sp.	n.s. ^c	-	<i>Ulocladium</i> sp.	1	0
AM262979	Unidentified yeast	<i>Ustilago</i> sp. ^d	95.04	<i>Ustilago</i> sp.	1	0
AM262387	Yeast-like anamorph	<i>Calycina herbarum</i>	92.01	Unknown Ascomycete 1	1	0
AM262372	Sterile mycelium	<i>Stenella araguata</i>	81.92	Unknown Ascomycete 2	1	0
AM262373	Sterile mycelium	<i>Dactylaria</i>	79.38	Unknown Ascomycete 3	1	0
		ampulliformis				
AM262374	Sterile mycelium	<i>Magnaporthe grisea</i>	91.22	Unknown Ascomycete 4	1	0
AM262377	Sterile mycelium	Ascomycete sp.	97.20	Unknown Ascomycete 5	1	0
AM262375	Sterile mycelium	Fungal endophyte	90.68	Unknown Ascomycete 6	1	0
AM262376	<i>Xylariaceae</i>	<i>Xylaria cornu-damae</i>	89.58	Unknown Ascomycete 7	1	0
AM262389	Sterile mycelium	<i>Verticillium</i> sp.	100	Unknown Ascomycete 8	1	0
AM262378	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium strictum</i>	74.94	Unknown Ascomycete 9	1	0
AM262379	Sterile mycelium	<i>Cistella grevillei</i>	92.34	Unknown Ascomycete 10	1	0
AM262380	Sterile mycelium	<i>Stachybotrys</i>	71.68	Unknown Ascomycete 11	1	0
		<i>cylindrospora</i>				
AM262388	<i>Acremonium</i> sp.	Leaf litter Ascomycete	79.57	Unknown Ascomycete 12	1	0
AM262381	Sterile mycelium	Leaf litter Ascomycete	92.75	Unknown Ascomycete 13	1	0
AM262385	Sterile mycelium	Ascomycete sp.	90.82	Unknown Ascomycete 14	1	0
AM262382	Sterile mycelium	Fungal endophyte	90.65	Unknown Ascomycete 15	0	1

Table 3. continued. Endophytic isolates identified by means of morphological and/or molecular characters, and isolates which could not be identified due to sterility and low homology to known nucleotide sequences, or high homology to sequences of unknown fungi in the EMBL fungi database.

Isolate accession number	Morphological identification	Sequence-based identification ^a	% FASTA identity ^a	Proposed identification	Presence in leaves	Presence in roots
AM262383	Sterile mycelium	Podospora cochleariformis	94.78	Unknown Ascomycete 16	1	0
AM262384	Sterile mycelium	<i>Epacris microphylla</i> root associated fungus	99.54	Unknown Ascomycete 17	1	0
AM262386	Sterile mycelium	Bamboo Basidiomycete	95.04	Unknown Basidiomycete	1	0

Note: ^aSimilarity to nucleotide sequences stored in the EMBL/Genbank database of fungal sequences was the criteria used to ascribe most isolates to a taxonomic group. Nucleotide sequences were searched with FASTA program. ^bMorphological identification was considered the correct option in cases where the database match is a different taxon and similarity is less than 95%. ^c(n.s.: not sequenced). ^{d,e}All species in the list are ascomycetes, except for nine basidiomycetes^d, and two zygomycetes^e. ^f Isolates were obtained from stem samples of 7 plants. For the five taxa showing more than one isolate, isolates were also obtained from leaf samples.

endophytes. On the PDA plates, fungi grew out of the plant fragments relatively fast; most isolates emerged in less than 10 days after the placement of plant samples on the plates.

Only 18% of the isolates obtained produced spores on PDA medium during the period of 6 to 8 weeks after isolation. The remaining isolates produced sterile mycelia. When sterile isolates were plated again on additional media, particularly on water agar with pieces of *D. glomerata* leaves, more isolates sporulated and could be morphologically identified. In total, 53% of all endophytic species could be identified by morphological characters. If the isolates identified as “unknown fungi” are excluded from the count (Table 3, bottom), then, 66% of the species could be identified with the use of phenotypic characters.

Molecular identification of isolates

The partial sequences obtained contained the complete nucleotide sequence of ITS1 and 5.8S rRNA, but most of them were incomplete at the 3' end of the ITS2 region. On the average, the sequences contained about 92% of the total ITS2 sequence (Table 4). In order to test if partial sequences of these characteristics were reliable for isolate identification, complete sequences were obtained for a subset of 12 isolates randomly chosen. In these 12 cases, the entry retrieved with FASTA from the EMBL/Genbank database was the same using a partial or a complete sequence (Table 2). This result suggests that partial sequences missing information at the 3' end may be as reliable as the complete versions for approximating an identification.

The following criteria were used to interpret matches provided by FASTA search of the EMBL fungal database: when sequence identity was greater than 97%, genus and species of the database result were accepted, when identity was 97 to 95%, only genus was accepted; when identity was less than 95% isolates were labelled as “unknown fungus”. Nevertheless, there were situations where similarity values were almost equally high for several species, in those cases species rank was doubtful and not accepted.

There were several cases in which nucleotide sequence homology was low (<95%), and the taxa indicated by the sequence did not correspond to the morphological identification. In such cases, the morphological identification was accepted.

A sequence similarity dendrogram consisting of all sequences was used to identify groups of very similar sequences. Each branch clustering very similar sequences was analyzed, and sequences differing by less than 3% were considered to belong to the same species. Establishing species differences

Table 4. A sample of 16 randomly chosen sequences showing the percentage of ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, obtained with a one-sided sequencing reaction and percentage of the total nucleotide sequence obtained.

Isolate accession number	% sequence obtained [*]			% of total sequence	EMBL reference sequence
	ITS1	5.8rRNA	ITS2		
AM262369	100	100	100	100	AB079127
AM262367	100	100	95.2	98.4	SAU77360
AM262417	100	100	88.3	96.1	AY004781
AM262413	100	100	100	100	AY853199
AM262394	100	100	89.5	96.5	ASP279479
AM262445	100	100	91.1	97	AF346409
AM262405	100	100	100	100	AB233343
AM262407	100	100	100	100	CCE293812
AM262347	100	100	100	100	AY373928
AM262402	100	100	100	100	CFU279450
AM262409	100	100	72.1	917	AJ390425
AM262349	100	100	96.1	98.7	PMA246159
AM262430	100	100	86.8	95.6	AY266144
AM262419	100	100	82.4	94.1	AF346409
AM262397	100	100	83.1	94.4	AJ413985
AM262357	100	100	92.1	97.4	AJ246145
Average	100	100	92.3	97.5	

^{*}To estimate the percentage of the total sequence obtained, each partial sequence was compared to the complete (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) reference sequence of the most similar EMBL database entry.

among sequences differing by more than 3% implied that in genera such as *Arthrinium*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Stagonospora*, and *Phomopsis*, multiple species were encountered, and isolates were grouped in different species denominated A, B, C, etc. (Table 3).

Using morphological and molecular characteristics for identification, 91 different species of fungi belonging to 63 genera could be identified (Tables 3 and 6). An additional set of sterile fungi belonging to 18 different taxa could not be identified because they had sequences different to any entry from the EMBL fungal database, or were similar to entries not assigned to any taxonomic group (Table 3, bottom). In total, 316 isolates representing 109 different species were obtained from the 107 plants infected by endophytes. Nucleotide sequences of each species were submitted to the EMBL/Genbank nucleotide database.

With respect to the plant tissue infected by the endophytes, 48 of the 91 identified species were found on leaves, 22 only on roots, and 21 species were found in both above and belowground parts (Table 3). Eight species were isolated from a set of stem samples of 7 plants. Three of these species were obtained only from the stem samples, isolates of the other five were also obtained from leaf samples (Table 3). Only 82 of the 120 plants had their roots plated for endophyte isolation. Therefore, the number of species obtained from aerial parts was probably proportionally greater than the number of species obtained from roots. However, the surface sterilization method used for roots was more aggressive than that used for leaves, and perhaps killed endophytes living close to the root surface.

The fungi isolated from diseased tissue obtained from plants showing symptoms, and from fructifications in dry culms are listed in Table 5.

Species diversity of the endophytic mycobiota

Most species identified were ascomycetes, only 9 species of basidiomycetes and 2 of zygomycetes were identified (Table 3). The identified Ascomycetes belonged to 54 different genera, and most could be grouped within 22 families (Table 6).

Seventy species were singletons, represented by only one isolate, and 39 species were plural, sampled more than once. The cumulative species curve calculated from all isolates (Fig. 1, curve a) suggests that increasing the number of plants analyzed would yield additional species. However, when a cumulative species curve was plotted with data from plural species, the curve approached asymptotic growth (Fig. 1, curve c). On the other hand, the shape of the species accumulation curve plotted for singleton species (Fig. 1, curve b) resembled the non-asymptotic curve obtained for all species.

The genera most abundant in terms of the number of isolates collected were: *Penicillium* (34 isolates), *Cladosporium* (21 isolates), *Acremonium* (20), *Helgardia* (18), *Podospora* (18), *Fusarium* (17), *Phaeosphaeria* (17), *Epicoccum* (15), *Epichloë* (8), *Alternaria* (7), *Chaetomium* (9), and *Lewia* (7). These 12 genera accounted for 57% of all isolates obtained, but represented only 25% of all species recorded.

Estimates of total species richness ranged from 261.52 (ICE) to 326 (Chao 2 estimator) When the values of ICE and Chao 2 estimators for each number of plant samples were plotted, none of them became asymptotic.

Shannon's index of diversity equalled 4.27 when all 109 fungal species were considered, and 3.45 when calculated only for the subgroup of plural species represented by more than one isolate. These values appear to be as high

as other endophytic communities, and suggested that this grass represents an ecosystem rich in endophytic mycobiota (Zak and Willig, 2004; Higgins *et al.*, 2007).

Table 5. Fungi isolated from lesion margins in diseased plants and from fructifications in dry culms.

On lesions	On dry culms
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>
<i>Ampellomyces humuli</i>	<i>Ampellomyces humuli</i>
<i>Cercospora sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Dreschlera dactylidis</i>
<i>Colletotrichum falcatum</i>	<i>Epicoccum sp.</i>
<i>Drechslera sp.</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<i>Drechslera biseptata</i>	<i>Glomerella acutata</i>
<i>Drechslera dactylidis</i>	<i>Fusarium poae</i>
<i>Dothideales sp.</i>	<i>Fusarium lateritium</i>
<i>Embellisia eureka</i>	<i>Hypocrea sp.</i>
<i>Epichloë typhina</i>	<i>Lewia infectoria</i>
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>
<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Phaeosphaeria sp.</i>
<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Phomopsis sp.</i>
<i>Fusarium poae</i>	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>
<i>Glomerella acutata</i>	
<i>Glomerella graminicola</i>	
<i>Helgardia sp.</i>	
<i>Hypocrea sp.</i>	
<i>Lewia infectoria</i>	
<i>Phaeosphaeria sp.</i>	
<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	
<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	
<i>Phoma sp.</i>	
<i>Phoma glomerata</i>	
<i>Phoma exigua</i>	
<i>Phomopsis sp.</i>	
<i>Rhexosporidium sp.</i>	
<i>Septoria passerinii</i>	
<i>Stagonospora arenaria</i>	
<i>Stemphylium solani</i>	
<i>Torribiella confragosa</i>	

Discussion

In studies where ITS sequences are used to approximate identifications, the sequences are usually obtained by sequencing both complementary strands of a PCR replicon containing the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region (Guo *et al.* 2000, Wirsal *et al.*, 2001). In the present study, nucleotide sequences were obtained from only one strand in a reaction driven by primer ITS4, upstream from the 5' end of ITS1. As shown in Table 4, the nucleotide sequences obtained by this method were missing approximately 10% of the 3' end of ITS2. However, a comparison of database results obtained with partial and complete sequences suggested that partial sequences were equally effective as the whole sequences for identification purposes (Table 2). Further evidence of the value of these partial sequences comes from the fact that there was agreement in the molecular and morphological identification, at least to genus rank, for all isolates whose identity to database entries was greater than 95% (Table 3). Therefore, although limited in value for rigorous phylogenetic analysis, partial sequences derived from single sequencing reactions can be useful for database interrogation when large numbers of isolates are processed.

In this survey, 91 different species of endophytic fungi belonging to 63 genera were identified (Tables 3 and 6). Eighteen additional species, representing 16.5% of the total number of species, could not be identified because they were sterile hyphae, and their ITS sequences did not resemble any species identified in the EMBL/Genbank database (Table 3, bottom). It is possible that some of these unidentified species are known species whose ITS sequences are not included in the database. Other species from the list of unidentified isolates may be truly unknown. Such results argue in favor of the potential of endophytic ecosystems for harboring some of the numerous undocumented fungal species (Hawksworth and Rossman, 1997; Pinnoi *et al.*, 2006).

In terms of isolate abundance, the *Dactylis* mycobiota ranged from a group of 70 singleton species, to a group of 39 plural species represented by 2 or more isolates. The shape of the species accumulation curves produced by the plural and singleton species data suggests that increasing sampling effort would yield new endophytic species (Fig. 1, curve a). However, the trend to an asymptotic curve seen in the case of plural species (Fig. 1, curve c) suggested that the sampling in this study detected most plural species associated with *Dactylis glomerata*. In contrast, the species accumulation curve of singleton species (Fig. 1, curve b) resembles the total species curve, showing a direct relationship between newly encountered fungal species and plants analyzed. This analysis of species accumulation curves suggested that sampling more

Table 6. Summary of endophytic taxa isolated from *Dactylis glomerata*.

PHYLUM/Order/Family	Number of genera	Number of species
ASCOMYCOTA		
<i>Chaetosphaeriales</i>		
<i>Chaetosphaeriaceae</i>	2	2
<i>Coniochaetales</i>		
<i>Coniochaetaceae</i>	1	1
<i>Diaporthales</i>		
<i>Valsaceae</i>	3	4
<i>Dothideales</i>		
<i>Botryosphaeriaceae</i>	1	1
<i>Eurotiales</i>		
<i>Trichocomaceae</i>	6	11
<i>Helotiales</i>		
<i>Hyaloscyphaceae</i>	2	2
Uncertain	1	1
<i>Hypocreales</i>		
<i>Clavicipitaceae</i>	4	4
<i>Hypocreaceae</i>	1	1
<i>Nectriaceae</i>	1	5
<i>Mycosphaerellales</i>		
<i>Mycosphaerellaceae</i>	2	2
<i>Onygenales</i>		
<i>Onygenaceae</i>	1	1
<i>Phyllachorales</i>		
<i>Glomerellaceae</i>	1	1
<i>Pleosporales</i>		
<i>Leptosphaeriaceae</i>	2	2
<i>Phaeosphaeriaceae</i>	2	6
<i>Pleosporaceae</i>	6	9
<i>Sordariales</i>		
<i>Lasiophaeriaceae</i>	3	8
<i>Xylariales</i>		
<i>Hyponectriaceae</i>	1	1
<i>Xylariaceae</i>	1	1
Uncertain		
<i>Apiosporaceae</i>	2	2
<i>Dermataceae</i>	1	1
<i>Myxotrichaceae</i>	1	1
<i>Pseudeurotiaceae</i>	1	1
Uncertain	8	12
BASIDIOMYCOTA		
<i>Corticiaceae</i>	1	1
<i>Cystofilobasidiaceae</i>	1	1
<i>Polyporaceae</i>	1	1
<i>Tricholomataceae</i>	1	1
<i>Ustilaginaceae</i>	1	1
Uncertain	2	4
ZYGOMYCOTA		
<i>Mortierellaceae</i>	1	1
<i>Cunninghamellaceae</i>	1	1
TOTAL	63	91

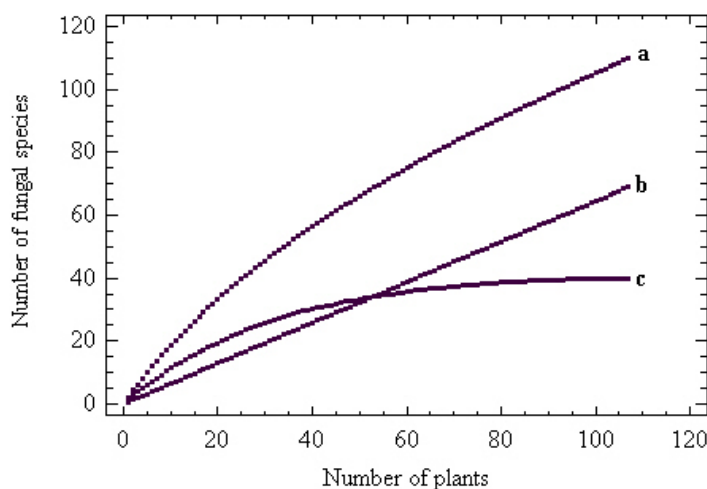


Fig. 1 Species accumulation curves showing the relationship between the number of plants analyzed and the total number of fungal species found (curve a). The curves for singleton (b) and plural (c) species were made with data subsets of species which were represented by one isolate (singletons), or of species represented by two or more isolates (plurals).

plants of *Dactylis glomerata* would yield new species, and the species found would most probably be singletons. Abundance of singleton species (Kauhanen *et al.*, 2006; Neubert *et al.*, 2006; Pinnoi *et al.*, 2006), as well as non asymptotic collection effort curves have been found in other endophyte surveys (Higgins *et al.*, 2007).

Estimators of total species richness can be used to predict where species accumulation curves may plateau. The estimates of the total species richness based on the data from Fig.1 (curve a) ranged from 326 (Chao 2 estimator) to 262 (ICE estimator). Because of the relatively high and constant proportion of singleton species, the curves produced by all estimators were non-asymptotic. Therefore, the values obtained should be interpreted as lower bound estimates of species richness (Gotelli and Coldwell, 2001).

The endophytic assemblage of *Dactylis* may be greater than what it is suggested by the estimates obtained. Technical constraints limited the number of endophytes identified; for example, some species may not have grown isolated with the media used, and obligate biotrophs could not be detected with the methods used. Nevertheless, methods useful to detect and identify

unculturable endophytes have been developed (Duong *et al.*, 2006; Neubert *et al.*, 2006).

Considering the number of endophytes identified, and the values for total species richness estimated for this grass, if the species richness of endophytic mycobiota were positively correlated to host plant size, many surveys of endophyte species in trees and shrubs probably underestimate the number of endophytic species (Stone *et al.*, 2004). The shortfall may be due to the fact that exclusively morphological identification was used in many earlier studies, and sterile isolates were not identified.

Webster (1956, 1957) studied the fungi appearing on decaying *Dactylis* culms, and recorded the sequence in which those species appeared after seed development in inflorescences. The first species recorded on mature culms were *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum purpurascens*, *Alternaria tenuis*, *Leptosphaeria microscopica* (= *Phaeosphaeria microscopica*), and *Pleospora vagans* (= *Phaeosphaeria vagans*). All these fungi belong to genera that we isolated frequently. Perhaps those early colonizers of decaying stems were already present in the living plants as endophytes; becoming saprophytes after stem senescence. We also isolated from dry culms fungi belonging to some of the genera of primary saprophytes described by Webster (Table 5).

The most extensive list of fungi identified on *D. glomerata* is a compilation of literature records made by Farr *et al.* (1989). Sixty-eight fungal species belonging to 41 genera were listed. Only 10 genera are common between that list and the one compiled in the present study: *Epichloë*, *Phaeosphaeria*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Periconia*, *Ascochyta*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Stagonospora*, and *Ustilago*. In the list of Farr *et al.* (1989), species of the above genera are associated with disease symptoms in plants. Therefore, it is very likely that some of the endophytes of the above genera were latent or weak *Dactylis* pathogens. This fact is supported by the fact that, except for *Periconia*, species of all of the above genera were also isolated from lesions of diseased plants (Table 5).

Most of the species isolated from diseased tissues (Table 5) are pathogens of grasses (Mathre, 1982; Wiese, 1987, Farr *et al.*, 1989). However, most of these species were also isolated from healthy plants (Table 3). Therefore, those fungi isolated from diseased and healthy plants may represent a group of latent pathogens.

Several genera of potential pathogens of cereal crops, e.g., wheat or barley, were present in asymptomatic plants of *Dactylis*. In those cereals, *Alternaria*, *Acremonium*, *Ascochyta*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cryptococcus*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Laetisaria*, *Leptosphaeria*, *Microdochium*, *Phoma*, *Stagonospora*, *Trichoderma*,

Ulocladium, and *Ustilago* are associated to several diseases (Mathre, 1982; Wiese, 1987, Farr *et al.*, 1989). Genera such as *Alternaria*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, and *Fusarium*, were frequently isolated as *Dactylis* endophytes. In addition, *Helgardia* sp., a pathogen associated to eyespot disease of cereals (Crous *et al.*, 2003) was one of the most abundant endophytes of *Dactylis*. Eighteen isolates of *Helgardia* sp., were obtained from plants at one location in La Coruña, five in Salamanca, and one in Ávila. *Helgardia* could be a pathogen of *Dactylis*, because it was also isolated from leaf lesions from diseased plants (Table 5). The above results implied that *D. glomerata*, a common grass species in Spain, could act as an alternative host and reservoir of potential pathogens of cereal crops.

The ascomycete predominance of the *Dactylis* mycobiota, and the presence of genera such as *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Stagonospora*, *Penicillium*, *Phoma*, and *Phomopsis* are characteristics common to endophytic assemblages from many plant species (Bills, 1996; Stone *et al.*, 2004; Schulz and Boyle, 2005). On the other hand, out of a group of 21 endophytic taxa that we could identify to species level, at least 6 appear to be specific of grasses: *Drechslera dactylidis*, *Epichloë typhina*, *Laetisaria arvalis*, *Periconia macrospinoso*, *Phaeosphaeria avenaria*, and *Stagonospora arenaria*; these species have not been described in hosts of other families (Farr *et al.*, 1989).

Although ascomycetes seem to dominate endophytic assemblages (Stone *et al.*, 2004; Duong *et al.*, 2006; Ganley and Newcombe, 2006; Morakotkarn *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2007), exceptions where basidiomycetes prevail have been described (Crozier *et al.*, 2006). The incidence of Zygomycete endophytes appears to be very low (Gonthier *et al.*, 2006).

Many endophytic genera described in other grasses such as *Phragmites australis* (Wirsel *et al.*, 2001), *Achnatherum sibiricum* (Wei *et al.*, 2007), or bamboo (Morakotkarn *et al.*, 2006), were also present in *Dactylis*. In contrast, the endophytic assemblage of *Dactylis* is quite different from that of woody perennials: out of 68 genera described as endophytes of leaves of woody perennials, only eight were found in *Dactylis*; and of 97 genera from bark and shoots of trees, only 10 genera were present in this grass (Stone *et al.*, 2004).

This study demonstrates that a small herbaceous plant can be considered to be an ecosystem which sustains a rich endophytic ensemble. This mycobiota is composed of a relatively small number of species commonly associated with the host, including several potential pathogens, and a predominant background of singleton species. Most endophytes identified appear to be host-generalists, because they have been described in other plant families.

Acknowledgements

We thank Manuel Sánchez Hernández, from the DNA Sequencing Service of the University of Salamanca.

References

- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 15649-15654.
- Bills, G.F. (1996). Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: *Endophytic fungi in grasses and woody plants* (eds. S.C. Erdlin, L.M. Carris). APS Press, USA: 31-65.
- Bouton, J. and Easton, S. (2005). Endophytes in forage cultivars. In: *Neotyphodium in cool-season grasses* (eds. C.A. Roberts, C.P. West, D.E. Spiers). Blackwell Publishing, USA: 327-340.
- Chazdon, R.L., Colwell, R.K., Denslow, J.S. and Guariguata, M.R. (1998). Statistical methods for estimating species richness of woody regeneration in primary and secondary rain forests of NE Costa Rica. In: *Forest biodiversity research, monitoring and modeling: Conceptual background and Old World case studies*. (eds. F. Dallmeier, J.A. Comiskey). Parthenon Publishing, France: 285-309.
- Clay, K. and Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160S: 99-127.
- Colwell, R.K. (2005). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. Persistent URL <purl.oclc.org/estimates>.
- Colwell, R.K. and Coddington, J.A. (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. England, Series B 345, 101-118.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z. and Gams, W. (2003). Eyespot of cereals revisited: ITS phylogeny reveals new species relationships. *European Journal of Plant Pathology* 109: 841-850.
- Crozier, J., Thomas, S.E., Aime, M.C., Evans, H.C. and Holmes, K.A. (2006). Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology* 55:783-791.
- Devarajan, P.T. and Suryanarayanan, T.S. (2006). Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. *Fungal Diversity* 23: 111-119.
- Duong, L.M., Jeewon, R., Lumyong, S. and Hyde, K.D. (2006). DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal endophytes. *Fungal Diversity* 23: 121-138.
- Ernst, M., Mendgen, K. and Wirsal, S.G.R. (2003). Endophytic fungal mutualists: Seed-borne *Stagonospora* sp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 580-587.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P. and Rossman, A.Y. (1989). *Fungi on plants and plant products in the United States*. American Phytopathological Society Press, USA.
- Ganley, R.J. and Newcombe, G. (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* 110:318-327.
- Gonthier, P., Gennaro, M. and Nicolotti, G. (2006). Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity* 21: 69-80.

- Gotelli, N.J. and Colwell, R.K. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4: 379-391.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147: 617-630.
- Hawksworth, D.L. and Rossman, A.Y. (1997). Where are all the undescribed fungi?. *Phytopathology* 87: 888-891.
- Higgins K.L., Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Sarvate, S.D. and Lutzoni, F. (2007). Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 543-555.
- Kauhanen, M., Vainio, E.J., Hantula, J., Eyjolfsson, G.G. and Niemelä, P. (2006). Endophytic fungi in Siberian larch (*Larix sibirica*) needles. *Forest Pathology* 36:434-446.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. In: *Briefings in Bioinformatics*. Vol 5. Oxford univ Press, USA: 150-163.
- Lumaret, R. (1988). Cytology, genetics, and evolution in the genus *Dactylis*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 7: 55-91.
- Mathre, D.E. (1982). *Compendium of barley diseases*. 2nd edn. American Phytopathological Society Press, USA.
- Morakotkarn, D., Kawasaki, H. and Seki, T. (2006). Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. *FEMS Microbiology Letters* 266:10-19.
- Neubert, K., Mendgen, K., Brinkmann, H. and Wirsal, S.G.R. (2006). Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1118-1128.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.M. and Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544-5550.
- Pearson, W.R. (1990). Rapid and Sensitive Sequence Comparison with PASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183: 63-98.
- Pinnoi, A., Lumyong, S., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G. (2006). Biodiversity of fungi on the palm *Eleiodoxa conferta* in Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. *Fungal Diversity* 22: 205-218.
- Promptutha, I., Jeewon, R., Lumyong, S., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2005). Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (*Magnoliaceae*). *Fungal Diversity* 20: 167-186.
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., Hugel, E., McKenzie, C., Hyde, K.D. and Jeewon, R. (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53: 579-590.
- Redman, R.S., Sheehan, K.B., Scout, R.G., Rodríguez, R.J. and Henson, J.M. (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298: 1581.
- Schulz, B. and Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Schulz, B., Guske, S., Dammann, U. and Boyle, C. (1998). Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25: 213-227.
- Stone, J.K., Polishook, J.D. and White Jr, J.F.. (2004). Endophytic fungi. In: *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods* (eds. G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster). Elsevier Academic Press, USA: 241-270.

- Strobel, G.A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 22: 315-333.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. and Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21-32.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Wang, F.W., Jiao, R.H., Cheng, A.B., Tan, S.H. and Song, Y.C. (2007). Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:79-83.
- Wang, Y., Guo, L.D. and Hyde, K.D. (2005). Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. *Fungal Diversity* 20: 235-260.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K.H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 13386-13391.
- Webster, J. (1956). Succession of fungi on decaying cocksfoot culms. Part I. *Journal of Ecology* 44: 517-544.
- Webster, J. (1957). Succession of fungi on decaying cocksfoot culms. Part II. *Journal of Ecology* 45: 1-29.
- Wei, Y.K., Gao, Y.B., Zhang, X., Su, D., Wang, Y.H., Xu, H., Lin, F., Ren, A.Z., Chen, L. and Nie, L.Y. (2007). Distribution and diversity of *Epichloë/Neotyphodium* fungal endophytes from different populations of *Achnatherum sibiricum* (Poaceae) in the Inner Mongolia Steppe, China. *Fungal Diversity* 24: 329-345.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols. A guide to methods and applications* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White). Academic Press, USA: 315-322.
- Wiese, M.V. (1987). *Compendium of wheat diseases*. 2nd ed. American Phytopathological Society Press, USA.
- Wirsal, S.G.R., Leibinger W., Ernst M. and Mendgen K. (2001). Genetic diversity of fungi commonly associated with common reed. *New Phytologist* 149: 589-598.
- Zak, J.C. and Willig, M.R. (2004). Fungal biodiversity patterns. In: *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods* (eds. G.M. Mueller, G.F. Bills, M.S. Foster). Elsevier Academic Press, USA: 59-75.

(Received 7 February 2007; accepted 11 July 2007)

Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses

Sánchez Márquez, S.¹, Bills, G.F.² and Zabalgoeazcoa, I.^{1*}

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Cordel de Merinas 40-52, 37008 Salamanca, Spain

²Centro de Investigación Básica de España, Merck, Sharp & Dohme, Josefa Valcárcel 38, 28027 Madrid, Spain

Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. and Zabalgoeazcoa, I. (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity* 33: 87-100.

Ammophila arenaria and *Elymus farctus* are two grasses which grow in sympatry in sand dunes of the Atlantic coasts of Europe. Culturable fungal endophytes were isolated from leaf and rhizome tissues of 84 plants of each species, sampled in 12 different locations in beaches of the northern coast of Galicia (Spain). Morphological and molecular techniques were used for the identification of fungi. One hundred and three different endophytic species were identified in both grasses, 75 in *Ammophila* and 54 in *Elymus*. The mean number of species identified did not significantly differ between leaves or rhizomes for any of the grasses. The endophytic assemblages of both grasses were dominated by species capable of infecting both hosts. Endophytes found in both grasses comprised 25% of all species recorded, but produced 61% of all isolates obtained. A statistically significant inverse relationship existed between the similarity of endophytic assemblages and their distance. This spatial effect and species accumulation curves suggested that increasing the number of plants or locations examined would reveal new endophytic species, mostly singletons represented by single isolates, on both grasses.

Key words: biodiversity, endophytes, molecular taxonomy, rDNA.

Article Information

Received 15 July 2008

Accepted 3 October 2008

Published online 30 November 2008

*Corresponding author: Iñigo Zabalgoeazcoa; e-mail: i.zabalgo@irnasa.csic.es

Introduction

Endophytic fungi may be isolated from healthy plant tissues, and all plants (Saikkonen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2004; Schulz and Boyle, 2005; Arnold, 2007; Wei *et al.*, 2007) and even lichens (Li *et al.*, 2007) may house endophytes. Fungal endophytes are abundant and taxonomically diverse (Photita *et al.*, 2001; Neubert *et al.*, 2006; Pinnoi *et al.*, 2006; Arnold, 2007; Arnold and Lutzoni, 2007). The use of molecular techniques has enabled identification of difficult (Guo *et al.*, 2003; Promputtha *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005) and unculturable species (Duong *et al.*, 2006) and several reports indicate more than 100 species of fungi may be associated with a single host species (Arnold *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2004). In addition, the composition of fungal communities may differ among plant species, tissues, geographically distant

regions, and environment (Collado *et al.*, 1999, Fröhlich *et al.*, 2001; Higgins *et al.*, 2007).

Studies on endophytes associated with plant species in environments where biotic or abiotic stress factors are present have been carried out (e.g. Fisher *et al.*, 1995; Gonthier *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2007; Porras Alfaro *et al.*, 2008) and have led to the discovery of several species of mutualistic endophytes which may improve plant adaptation (Arnold *et al.*, 2003; Schardl *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2007; Rodríguez and Redman, 2008; Zabalgoeazcoa, 2008). A practical application of this knowledge is that mutualistic endophytes, like some *Neotyphodium* and *Epichloë* species, are currently being used for the improvement of forage and turfgrass cultivars (Schardl *et al.*, 2004; Bouton and Easton, 2005). These two genera include the most studied endophytes, but some surveys suggest that they only represent a small fraction

of the endophytic species which may be associated to grasses (e.g. Morakotkarn *et al.*, 2006; Neubert *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007)

In this work, we have studied the endophytic mycobiota of *Ammophila arenaria* and *Elymus farctus* (= *Agropyron junceiforme*), two perennial grasses which grow in sand dunes on beaches, where they are often buried by sand or have their roots flooded by seawater at high tide. The objectives of the work were to describe the endophytic assemblages of these grasses. This would include the identification and quantification of the species associated to each grass, including multihost species capable of infecting both species, as well as studying the differences in endophytic species composition observed at different locations.

Materials and Methods

Plants and collection sites

Ammophila arenaria and *Elymus farctus* are native to the Atlantic coasts of Europe (Hubbard, 1984). On the northern coast of the Iberian Peninsula, they grow in sympatry in beach foredunes. To propagate and to overcome sand burial both species produce vertical and horizontal rhizomes. *Ammophila* plants are larger and grow in more compact tufts than *Elymus*. Plants of both species were obtained in twelve locations on seven sandy beaches of the northern coast of Galicia, in the Atlantic coast of Spain (Fig. 1). This coast consists of tall rock cliffs with some interspersed beaches, and it has a humid Atlantic climate. In four beaches (Doniños, Esteiro, Lago, and Villarrube) plants were obtained from two or three locations, while on the three remaining beaches, plants were obtained at only one location (Table 1). Different sampling locations within the same beach were at least 500 m apart. At each location seven plants of each species were sampled, leaving a distance of at least 10 m between pairs of plants. In total, 84 plants of each species were obtained. The plants were processed for endophyte isolation in less than 48 hours after sampling.

Isolation of fungi

Endophytes were isolated from samples of 4-5 segments obtained from a single

rhizome from four of the seven plants. Samples of asymptomatic leaves and rhizomes from each plant were cut transversally into 4 mm

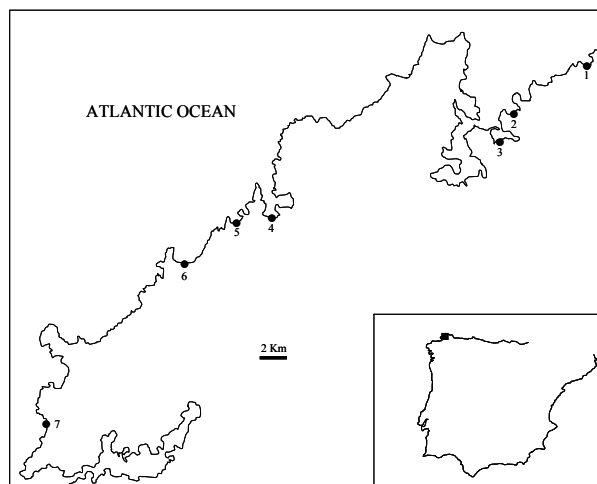


Fig. 1. Location of beaches in the northern coast of Galicia (Spain) where plants were sampled. The square in the map of the Iberian peninsula shows the position of the larger map. The locations indicated by numbers are Esteiro (1), Espasante (2), Morouzos (3), Villarrube (4), Pantín (5), Lago (6), and Doniños (7). In beaches 1, 4, 6 and 7, plants were sampled at more than one location.

long fragments which were surface-disinfected and plated in potato dextrose agar (Sánchez *et al.*, 2007). The effectiveness of the surface disinfection methods was tested with imprints of leaf and rhizome fragments made in PDA plates (Schulz *et al.*, 1998). All isolates obtained from each leaf and rhizome sample were classified according to their morphological appearance into morphotypes, for each sample only one isolate of each morphotype was kept for further identification.

Morphological and molecular identification

To induce sporulation in non-sporulating isolates not producing spores in PDA, the strains were plated in water agar, and water agar containing sterilized pieces of leaves of their host, *Ammophila* or *Elymus*. Whenever possible, the identification of endophytes was based on morphological and molecular characters. The molecular marker used for identification was the nucleotide sequence of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region. Amplicons of this region were obtained using the method described by Sánchez *et al.* (2007), and sequenced using primers ITS4 and ITS5 (White *et al.*, 1990). Isolates whose sequences had a

Table 1. Number of fungal species identified in leaves and rhizomes of *Ammophila arenaria* (Aa) and *Elymus farctus* (Ef) at twelve locations on beaches in the northern coast of Galicia, Spain. At each location endophytes were isolated from leaf samples from seven plants and rhizome samples from four plants of each species. Shannon's diversity index (H') was estimated from the total number of endophytic species observed at each location, and also for all species found in each host grass (All plants). Differences between grass hosts in the average number of endophytic species found in leaves, rhizomes, and both organs were tested with a Student's t test. Bold type numbers in the average line indicate significant differences with $p < 0.05$.

Location	Number of endophytic species observed						Species diversity (H')	
	Leaves		Rhizomes		Total		Aa	Ef
	Aa	Ef	Aa	Ef	Aa	Ef		
Doniños, A	9	5	7	0	13	5	2.24	1.61
Doniños, B	8	5	6	1	12	5	2.31	1.55
Espasante	4	5	3	1	6	5	1.54	1.54
Esteiro, A	5	6	3	8	8	12	2.08	2.23
Esteiro, B	10	4	3	7	12	9	2.27	1.92
Lago, A	5	5	5	5	9	9	2.09	2.16
Lago, B	12	11	4	7	15	16	2.52	2.53
Morouzos	12	5	7	8	17	10	2.71	2.09
Pantín	5	2	7	4	11	5	2.30	1.47
Villarrube, A	10	7	4	9	14	14	2.55	2.50
Villarrube, B	10	6	10	2	18	6	2.70	1.60
Villarrube, C	14	11	2	5	15	13	2.71	2.37
Average	8.67	6.00	5.08	4.75	12.5	9.08	2.33	1.96
All plants	51	36	38	34	75	54	3.67	3.27

similarity greater than 95% were considered to belong to the same species. This 5% difference used to define species boundaries appears to correlate well with differences among known endophytic species (Arnold and Lutzoni, 2007).

Sequence-based identifications were made by searching with FASTA algorithms the EMBL/Genbank database of fungal nucleotide sequences (Pearson, 1990). Genus and species of the database match were accepted whenever identity between our sequence and that of the database was greater than 97%; only the genus was accepted when identity to a database match was from 96.9 to 95%, and when the similarity was less than 95%, the isolates were considered unidentified. Morphological examination was used to clarify ambiguities and to confirm results of sequence similarity searches.

Fungal diversity estimations

All identified endophytes were classified into species isolated exclusively from *Ammophila* or from *Elymus*, and species isolated from both hosts. Multi-host endophytes belonging to the last group were considered general-

ists. Shannon's diversity index (H') was calculated for each set of endophytic species observed at each location on each host, and for the set of all species observed on each host (Zak and Willig, 2004). The average species diversity (H'), and the mean number of species isolated at each location were compared between hosts using a Student's t test with $\alpha = 0.05$.

Species accumulation curves were used to plot the relationship between the number of plants analyzed and fungal species encountered (Colwell, 2005). To estimate the total number of endophytic species which could be associated with *Ammophila* and *Elymus*, several non-parametric estimators of species richness (Chao 1, Chao 2, ACE, ICE, Michaelis-Menten, Bootstrap) were evaluated (Magurran, 2004).

Tissue and location effects

Differences in the average number of species present in leaves and rhizomes were tested with a Student's t test with $\alpha = 0.05$. The data used was the number of species observed in four leaf samples and four rhizome samples at each location.

The similarity of the species composition of each pair of locations was estimated using Jaccard's index of similarity (Magurran, 2004). That index was calculated for each grass from presence/absence data for all endophytic species occurring at more than one location. The relationship between the index of similarity and the distance among locations was tested by linear regression (Arnold *et al.*, 2003; Gange *et al.*, 2007). Regression was applied after a Kolmogorov-Smirnov test confirmed that the Jaccard similarity data for each plant species followed a normal distribution.

Spatial effects on the presence and specificity of generalist species were estimated by comparing the similarity indexes of the assemblages of both grasses at the same location with those of each grass at different locations, or of both grasses at different locations. Comparisons of the similarity indexes obtained between hosts at each location ($n = 12$) with those of all possible pairwise combinations the same host in different locations ($n = 66$), and those of interhost combinations at different locations ($n = 144$) were made using a Student's *t* test with $\alpha = 0.05$. The normal distribution of the above similarity data was checked with a Kolmogorov-Smirnov test.

Results

Fungal isolation and species identification

Endophytes were isolated from all plants processed. The imprint tests indicated that the surface disinfection procedures efficiently eliminated epiphytic mycobiota.

Leaf and rhizome samples obtained from 84 plants of each species, yielded 950 isolates. After grouping isolates belonging to the same morphotype, 211 representative isolates, 128 from *Ammophila* and 83 from *Elymus*, were selected for sequencing. These 211 sequences were analyzed and those differing by less than 5% homology were considered to belong to the same species; as a result 94 different taxa were identified by means of ITS sequences. Thirty eight of these species were sterile mycelia, and their identification was based exclusively on molecular characters. The remaining 56 species were identified using both morphological and molecular characters. In addition, 9 species were identified solely with morphological

characters. In total, 103 different species were identified, 24 of these species could not be identified to genus rank, but could be classified as ascomycetes, basidiomycetes, or assigned to an order or family (e.g., Helotiales, *Xylariaceae*) (Tables 2-4). Except for 5 basidiomycete taxa (*Cryptococcus*, *Kondoa*, *Meira*, *Phlebia*, and unknown basidiomycete 1), all species belonged to the *Ascomycota*.

Excluding unidentified species, the endophytic assemblage of both grasses belonged to 62 genera. The 10 most abundant genera were *Alternaria*, *Acremonium*, *Podospora*, *Penicillium*, *Microdochium*, *Arthrinium*, *Leptosphaeria*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, and *Beauveria*. Sixty two percent of all isolates obtained belonged to these genera. Unknown Ascomycete sp. 1 was also one of the most abundant endophytes. In contrast to the above genera, which were isolated from both grasses, this endophyte only occurred in *Ammophila*.

Host effects and diversity

The endophytic fungi isolated from *Ammophila arenaria* could be assigned to 75 different species, and those from *Elymus farctus* to 54. Forty nine species were found exclusively in plants of *Ammophila* (Table 2), 28 only in *Elymus* (Table 3), and 26 species were generalists common to both grasses (Table 4).

The mean number of species found at each location (Table 1) was significantly greater for *Ammophila* than for *Elymus* ($t = 2.5721$, $P < 0.05$). Across locations, Shannon's diversity index, which is a function of the number of species and isolates, was also significantly greater for *Ammophila* than for *Elymus* ($t = -2.4518$, $P < 0.05$).

Forty eight of the 103 species identified in both plants were plurals represented by more than one isolate, the remaining species were singletons, represented by a single isolate. In *Ammophila* 48% of the endophytic species were plurals, and in *Elymus* 52%.

Species accumulation curves for all species identified in each grass were non-asymptotic, but the curves showing the accumulation of plural species approached asymptotic growth for both grasses (Fig. 2). All estimators of the total number of fungal species that were evaluated produced non-asymptotic species accumulation curves for both *Ammo-*

Table 2. Endophytic species isolated only from plants of *Ammophila arenaria*.

Accession	Morphological identification	Sequence-based identification	% FASTA similarity	Proposed identification	Number of isolates	
					Leaves	Rhizomes
AM921701	Sterile mycelium	<i>Coniosporium</i> sp.	91.53	Unknown Ascomycete 1	19	3
882F	<i>Arthrinium</i> sp.	n.s. ¹	--	<i>Arthrinium</i> sp.	5	2
AM921702	Sterile mycelium	<i>Gliomastix murorum</i>	98.29	<i>Gliomastix murorum</i>	0	5
AM921703	Helotiales	<i>Heyderia abietis</i>	88.82	Unidentified Helotiales A	2	2
AM921735	Sterile mycelium	<i>Scutellinia</i> sp.	74.04	Unknown Ascomycete 2	0	4
AM921704	Sterile mycelium	<i>Cordyceps sinensis</i>	96.41	Unknown Hypocreales	4	0
AM921705	Sterile mycelium	<i>Lophodermium actinothyrium</i>	95.46	<i>Lophodermium</i> sp.	3	0
AM921738	Unidentified yeast	<i>Cryptococcus victoriorum</i>	100.00	<i>Cryptococcus victoriorum</i>	0	2
AM921706	<i>Dactylaria</i> sp.	<i>Dactylaria</i> sp.	97.72	<i>Dactylaria</i> sp.	0	2
AM921707	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora oryzae</i>	97.84	<i>Nigrospora oryzae</i>	2	0
AM921708	<i>Periconiella</i> sp.	<i>Periconiella</i> sp.	94.59	<i>Periconiella</i> sp.	2	0
AM921709	<i>Stagonospora</i> sp.	<i>Stagonospora</i> sp.	98.31	<i>Stagonospora</i> sp.	2	0
AM921710	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma viride</i>	99.81	<i>Trichoderma viride</i>	2	0
AM921711	Sterile mycelium	Limestone ascomycete	89.26	Unknown Ascomycete 3	2	0
AM921739	Sterile mycelium	<i>Scolecobasidium variabile</i>	70.97	Unknown Ascomycete 4	0	2
AM921712	Sterile mycelium	Fungal sp.	90.37	Unknown Ascomycete 5	2	0
AM930536	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Sepedonium chlorinum</i>	71.91	<i>Acremonium</i> sp. A	0	1
AM921713	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	100.00	<i>Aspergillus niger</i>	0	1
AM921714	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus versicolor</i>	99.78	<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0
AM921736	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium globosum</i>	98.66	<i>Chaetomium globosum</i>	1	0
AM921740	Sterile mycelium	<i>Coprinellus radians</i>	97.76	<i>Coprinellus radians</i>	1	0
AM921715	Unidentified yeast	<i>Debaryomyces hansenii</i>	97.37	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	1
AM921716	Sterile mycelium	<i>Engyodontium album</i>	99.81	<i>Engyodontium album</i>	1	0
AM921717	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	Fungal endophyte	96.41	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	0	1
AM921741	<i>Helgardia</i> sp.	<i>Helgardia anguioides</i>	99.78	<i>Helgardia anguioides</i>	1	0
AM921718	<i>Kabatiella</i> sp.	Fungal sp.	85.49	<i>Kabatiella</i> sp.	1	0
AM921719	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp.	98.17	<i>Leptosphaeria</i> sp. A	0	1
AM921720	<i>Lophiostoma</i> sp.	<i>Cercophora coprophila</i>	90.66	<i>Lophiostoma</i> sp.	1	0
AM921721	Sterile mycelium	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100.00	<i>Macrophomina phaseolina</i>	0	1
AM921742	<i>Meira</i> sp.	<i>Meira</i> sp.	98.99	<i>Meira</i> sp.	1	0
AM921743	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	98.67	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	0
2908IR	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	n.s. ¹	--	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	1	0
AM921722	<i>Phialemonium</i> sp.	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	99.79	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	1	0

n.s.¹ = non sequenced

Table 2 (continued). Endophytic species isolated only from plants of *Ammophila arenaria*.

Accession	Morphological identification	Sequence-based identification	% FASTA similarity	Proposed identification	Number of isolates	
					Leaves	Rhizomes
AM921744	Sterile mycelium	<i>Phlebia radiata</i>	98.63	<i>Phlebia radiata</i>	1	0
AM921723	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	96.21	<i>Phomopsis</i> sp. A	0	1
AM921724	Sterile mycelium	<i>Phomopsis</i> sp.	96.58	<i>Phomopsis</i> sp. B	1	0
AM921725	Sterile mycelium	<i>Phyllosticta pyrolae</i>	98.62	<i>Phyllosticta pyrolae</i>	0	1
AM921726	Sterile mycelium	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	94.66	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	0	1
AM921727	Sterile mycelium	<i>Sarea</i> sp.	99.80	<i>Sarea</i> sp.	1	0
AM921728	Sterile mycelium	<i>Dothioraceae</i> sp.	99.81	<i>Sydowia polyspora</i>	1	0
AM921729	Pleosporales	Ascomycete sp.	95.63	Unidentified Pleosporales A	0	1
AM921730	Pleosporales	Fungal sp.	91.03	Unidentified Pleosporales B	0	1
AM921731	<i>Xylariaceae</i>	<i>Muscodor albus</i>	84.89	Unidentified <i>Xylariaceae</i>	1	0
AM921737	Sterile mycelium	<i>Dactylaria appendiculata</i>	93.08	Unknown Ascomycete 6	0	1
AM921732	Sterile mycelium	<i>Zopfiella karachiensis</i>	93.32	Unknown Ascomycete 7	0	1
AM921745	Sterile mycelium	<i>Trimmatostroma salinum</i>	91.08	Unknown Ascomycete 8	1	0
AM921746	Sterile mycelium	<i>Preussia isomera</i>	76.99	Unknown Ascomycete 9	0	1
AM921733	Sterile mycelium	<i>Eutypa lata</i>	82.31	Unknown Ascomycete 10	1	0
AM921734	Sterile mycelium	Fungal endophyte	80.95	Unknown Ascomycete 11	1	0

n.s.[†] = non sequenced

Table 3. Endophytic species isolated exclusively from plants of *Elymus farctus*.

Accession	Morphological identification	Sequence-based identification	% FASTA similarity	Proposed identification	Number of isolates	
					Leaves	Rhizomes
AM922199	Sterile mycelium	Fungal sp.	90.64	Unknown Ascomycete 12	1	5
AM922200	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	<i>Phaeosphaeria pontiformis</i>	97.46	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	3	0
AM922201	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria hypoxylon</i>	92.11	<i>Xylaria</i> sp. B	3	0
AM922202	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	99.44	<i>Chaetomium</i> sp. B	0	2
3093IR	<i>Drechslera</i> sp.	n.s. ¹	--	<i>Drechslera</i> sp.	0	2
AM922203	Sterile mycelium	Foliar endophyte	75.38	Unknown Ascomycete 13	2	0
AM922204	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium alternatum</i>	96.51	<i>Acremonium</i> sp. C	1	0
AM922205	<i>Anthostomella</i> sp.	<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	98.01	<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	1	0
AM922206	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	100.00	<i>Arthrinium</i> sp. B	1	0
AM922225	Sterile mycelium	<i>Chaetosphaeria</i> sp.	95.25	<i>Chaetosphaeria</i> sp.	0	1
AM922221	<i>Coelomycete</i>	<i>Epacris microphylla</i> root	89.65	<i>Coelomycete</i>	1	0
AM922207	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Coniothyrium cereale</i>	100.00	<i>Coniothyrium cereale</i>	0	1
AM922208	<i>Emericellopsis</i> sp.	<i>Emericellopsis</i> sp.	98.34	<i>Emericellopsis</i> sp.	1	0
AM922209	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	99.44	<i>Gibberella avenacea</i>	0	1
AM922210	Sterile mycelium	<i>Hypoxylon perforatum</i>	97.66	<i>Hypoxylon</i> sp.	1	0
AM922224	Unidentified yeast	<i>Kondoa aerea</i>	99.62	<i>Kondoa aerea</i>	1	0
AM922211	Sterile mycelium	<i>Neofabraea alba</i>	100.00	<i>Neofabraea alba</i>	1	0
AM922212	Sterile mycelium	<i>Phialocephala</i> sp.	99.83	<i>Phialocephala</i> sp.	0	1
AM922213	Sterile mycelium	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	99.35	<i>Phomopsis</i> sp. C	0	1
AM922214	<i>Schizothecium</i> sp.	<i>Podospora tetraspora</i>	99.77	<i>Schizothecium</i> sp.	1	0
AM922215	<i>Cytospora</i> sp.	<i>Valsa fabianae</i>	100.00	<i>Valsa fabianae</i>	1	0
AM922222	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Verticillium nigrescens</i>	100.00	<i>Verticillium nigrescens</i>	0	1
AM922216	<i>Verticillium</i> sp.	<i>Verticillium balanoides</i>	96.07	<i>Verticillium</i> sp.	0	1
AM922217	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	97.69	<i>Xylaria</i> sp.	0	1
AM922218	Pleosporales	<i>Leptosphaeria contecta</i>	92.43	Unidentified Pleosporales C	0	1
AM922219	Xylariales	<i>Hypoxylon multifforme</i>	93.70	Unidentified Xylariales	1	0
AM922220	Sterile mycelium	<i>Nodulisporium</i> sp.	90.45	Unknown Ascomycete 14	0	1
AM922223	Sterile mycelium	<i>Plicaturopsis crispa</i>	77.96	Unknown Basidiomycete	1	0

n.s.¹ = non sequenced

Table 4. Endophytic species isolated from leaves (L) and rhizomes (R) of *Ammophila arenaria* (Aa) and *Elymus farctus* (Ef).

Accession	Morphological identification	Sequence-based identification	% FASTA similarity	Proposed identification	Number of isolates			
					Aa		Ef	
					L	R	L	R
1883IR	<i>Alternaria</i> sp.	n.s. ¹	--	<i>Alternaria</i> sp.	53	9	46	20
1892IR	<i>Podospora</i> sp.	n.s.	--	<i>Podospora</i> sp.	13	4	13	4
1869IR	<i>Acremonium</i> sp.	n.s.	--	<i>Acremonium</i> sp.	11	5	6	5
AM924149	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Nectria mauritiicola</i>	94.27	<i>Acremonium</i> sp. B	10	0	1	3
AM924150	<i>Microdochium</i> sp.	<i>Microdochium</i> sp.	100.00	<i>Microdochium</i> sp.	0	8	1	4
884F	<i>Penicillium</i> sp.	n.s.	--	<i>Penicillium</i> sp.	3	2	5	3
1901IR	<i>Epicoccum nigrum</i>	n.s.	--	<i>Epicoccum nigrum</i>	6	0	5	0
AM924151	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Leptosphaeria</i> sp.	98.17	<i>Leptosphaeria</i> sp. B	0	3	0	8
AM924152	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium strictum</i>	99.82	<i>Acremonium strictum</i>	2	2	2	4
1913IR	<i>Cladosporium</i> sp.	n.s.	--	<i>Cladosporium</i> sp.	3	2	6	0
AM924153	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Cordyceps bassiana</i>	100.00	<i>Beauveria bassiana</i>	4	0	3	2
AM924154	<i>Gaeumannomyces</i> sp.	<i>Gaeumannomyces cylindrosporum</i>	99.28	<i>Gaeumannomyces cylindrosporum</i>	0	5	0	1
AM924155	Sterile mycelium	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	98.80	<i>Pestalotiopsis</i> sp. B	3	0	2	1
AM924156	<i>Thielavia</i> sp.	<i>Thielavia coactilis</i>	95.71	<i>Thielavia</i> sp.	1	0	3	2
AM924157	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia inaequalis</i>	100.00	<i>Curvularia inaequalis</i>	4	0	1	1
AM924158	Helotiales	Ericoid mycorrhizal sp.	92.23	Unidentified Helotiales B	0	1	1	3
AM924159	<i>Arthrinium</i> sp.	<i>Arthrinium</i> sp.	100.00	<i>Arthrinium</i> sp. A	1	1	2	0
AM924160	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium alternatum</i>	99.10	<i>Acremonium alternatum</i>	1	0	0	2
AM924161	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100.00	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	1	1	1
AM924162	Sterile mycelium	<i>Stemphylium solani</i>	99.09	<i>Stemphylium solani</i>	2	0	1	1
AM924163	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Torrubiella confragosa</i>	99.65	<i>Lecanicillium lecanii</i>	1	1	2	0
878F	<i>Chaetomium</i> sp.	n.s.	--	<i>Chaetomium</i> sp.	1	1	1	1
AM924164	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100.00	<i>Pestalotiopsis</i> sp. A	1	0	0	1
AM924165	<i>Plectosphaerella</i> sp.	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	99.06	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	0	1	0	1
AM924166	Sterile mycelium	<i>Preussia australis</i>	96.36	<i>Preussia australis</i>	1	1	1	1
AM924167	Sterile mycelium	<i>Emarcea castanopsidicola</i>	87.11	Unknown Ascomycete 15	1	0	0	1

n.s.¹ = non sequenced

phila and *Elymus*. The Chao 1 and Chao 2 singletons, represented by a single isolate. In *Ammophila* 48% of the endophytic species were plurals, and in *Elymus* 52%.

Species accumulation curves for all species identified in each grass were non-asymptotic, but the curves showing the accumulation of plural species approached asymptotic growth for both grasses (Fig. 2). All estimators of the total number of fungal species that were evaluated produced non-asymptotic species accumulation curves for both *Ammophila* and *Elymus*. The Chao 1 and Chao 2 estimators produced greater estimates of total number of species for *Elymus* than for *Ammophila*. This unexpected difference occurred because these estimators are based on the ratio of singleton to doubleton species found in the sample (Magurran, 2004), and this ratio was greater for *Elymus* (33 singletons and 4 doubletons) than for *Ammophila* (43 singletons and 13 doubletons). The ACE, ICE, Bootstrap and Michaelis-Menten estimators did not cause this overestimate. The highest estimates of the total number of species were obtained with the incidence-based coverage estimate (ICE), with 154.58 species for *Ammophila* and 116.27 for *Elymus*; the lowest estimates were provided by the Bootstrap estimator, with 92.65 species for *Ammophila* and 66.89 for *Elymus*. Since the accumulation curves produced by all estimators were non-asymptotic, their numbers should be considered lower bound estimates of the total number of species (Gotelli and Colwell, 2001).

The endophytic mycobiota of each grass species was dominated by generalist species (Table 4). In *Ammophila*, seven of the 10 most abundant species were generalists, these 10 species were represented by 158 isolates, comprising 59% of all isolates identified in this grass. In *Elymus* 9 of the 10 most abundant species were generalists, and represented 64% of all *Elymus* isolates.

Tissue and location effects

In *Ammophila* 51 species were isolated from leaves and 38 from rhizomes; in *Elymus* 36 species came from leaves and 34 from rhizomes (Table 1). The average number of species isolated from rhizomes did not significantly differ between both plant hosts ($t = 0.1236$, $P > 0.05$), but significantly more species

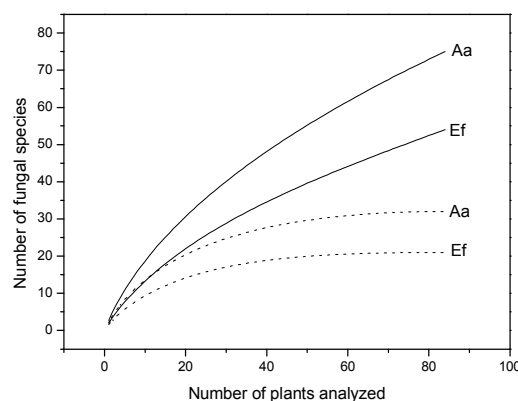


Fig. 2. Species accumulation curves showing total number of species (continuous lines), and plural species consisting of at least two isolates (dashed lines) identified in plants of *Ammophila arenaria* (Aa) and *Elymus farctus* (Ef).

were found in *Ammophila* than in *Elymus* ($t = 3.6446$, $P < 0.01$).

When species data from 4 leaf and 4 rhizome samples at each location was analyzed to find out if there were differences between these tissues, no significant differences were observed in *Ammophila* (6.58 species in leaves and 5.08 in rhizomes; $t = -1.6912$, $P > 0.05$) or in *Elymus* (4.92 species in leaves and 4.92 in rhizomes, $t = 0.0$; $P > 0.05$).

Fourteen species from *Ammophila* (19%) and 7 from *Elymus* (30%) were isolated from leaves and rhizomes. Because isolate numbers were small, it is impossible to assert if some species are exclusive to leaves or rhizomes; however, species like *Gliomastix murorum* (Table 2) or *Epicoccum nigrum* (Table 4) were found exclusively in rhizomes or leaves.

As expected from the high number of singleton species observed, many species occurred only at one location. The most cosmopolitan species was *Alternaria* sp., which was found at all 12 locations in both grasses. Other taxa found at five or more locations were *Podospora*, *Acremonium*, *Epicoccum*, *Penicillium*, and Unknown ascomycete sp. 1.

A statistically significant inverse relationship between the similarity in endophytic species composition and distance among locations occurred for *Ammophila* ($R = -0.3049$; $P < 0.05$) and for *Elymus* assemblages ($R = -0.3573$, $P < 0.01$) (Fig. 3). The Jaccard

similarity data obtained for all pairs of locations was found to adjust to a normal distribution for both *Ammophila* (Kolmogorov – Smirnov $d = 0.1126$, $P > 0.05$) and *Elymus* ($d = 0.0950$, $P > 0.05$).

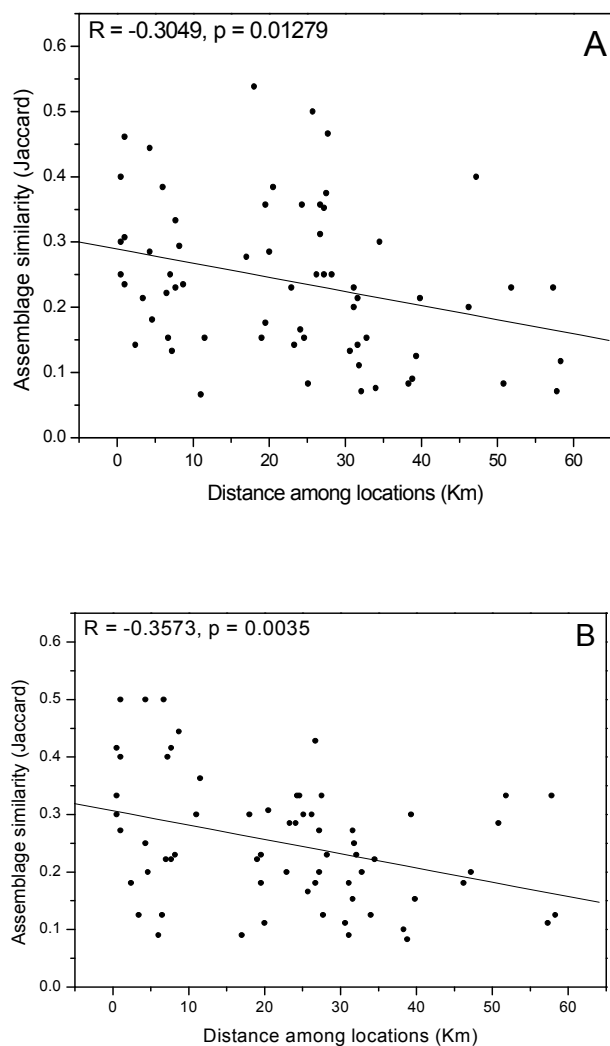


Fig. 3. Relationship between the similarity in species composition among pairs of locations and their distance. Assemblages of leaf endophytes of *Ammophila arenaria* (A) and *Elymus farctus* (B) were compared at 12 locations. Only species present at more than one location were considered for the comparisons, there were 26 such species in *Ammophila* and 18 in *Elymus*. Jaccard coefficients were used to estimate the similarity in the endophyte assemblages for all pairs of locations, and the relationship between similarity and distance was tested by linear regression.

The mean similarity of the assemblages of generalist species was greater between both grasses at the same location (0.317), than among assemblages of the same grass at different locations (*Ammophila* = 0.245; *Elymus* = 0.239), or between both grasses at dif-

ferent locations (0.273). The difference in the mean similarity between different host species in the same location, and that within the same species in different locations was statistically significant for *Elymus* ($t = -2.0979$, $P < 0.05$), but not for *Ammophila* ($t = -1.790$, $P > 0.05$), or for both grasses compared at different locations ($t = -1.1215$, $P > 0.05$).

Discussion

Both *Elymus* and *Ammophila* sustain a highly diverse culturable endophytic mycobiota. One hundred and three different fungal species were isolated from both hosts, 75 from *Ammophila* and 54 from *Elymus* (Tables 2-4). The non-asymptotic species accumulation curves, and the variation observed among locations, suggest that more endophytic species would have been found if more plants or locations were analyzed (Figs 2, 3). The slope of the last 20 data points of the species accumulation curve for *Ammophila* was 0.55, and for *Elymus* was 0.41. These numbers suggest that for every two or three additional plants analyzed, one more endophytic species would be found. The high proportion of singleton species, 53% of all species but only 11% of all isolates, had an important influence in the shape of the species accumulation curves. When curves were based only on data from plural species, those having more than one isolate, the resulting curves were asymptotic (Fig. 2). These results suggest that there is a limited number of plural species infecting each grass, and our survey identified most them. On the other hand, an extremely diverse group of singleton species only occasionally infect the plants. Therefore, increased plant sampling would most likely extend the identification of new singleton species.

Based on the data obtained, the ICE and Bootstrap estimators of total number of species point out that at least 155 to 93 species could be found in *Ammophila*, and 116 to 67 in *Elymus*. It is very likely that these numbers underestimate the endophytic mycobiota of the plants analyzed. For instance, different isolation media or sample processing techniques, like particle filtration, could have produced different or even more culturable species (Collado *et al.*, 2007). Furthermore, the iso-

lation method we used does not allow for the detection of non culturable endophytic species (Kowalchuk *et al.*, 1997; Duong *et al.*, 2006; Neubert *et al.*, 2006; Hyde and Soyong, 2007).

The endophytic assemblage of each grass was dominated by a relatively small number of plurivorous species. In each grass, 10% of its endophytic species accounted for more than 50% of the isolates obtained, and multihost species were the majority in this group (Table 4). This situation of dominance by multihost species was also observed in other studies of endophytic assemblages of sympatric hosts (Seena and Sridar, 2004; Gange *et al.*, 2007; White and Backhouse, 2007). Several of these dominant multihost species (e.g. *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*) are ubiquitous endophytes present in other grasses and plant families (Stone *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2007).

Host-specific endophytes were difficult to identify because many taxa were only represented by one or few isolates. However, “unknown ascomycete sp. 1” (Table 2) appears to be a host-specific endophyte; 22 isolates were obtained from *Ammophila* plants at five different locations. “Unknown ascomycete 12” from *Elymus* (Table 3) could also represent a host-specific taxon. These “unknown ascomycetes”, as well as some of the most frequent generalist taxa could be good candidates to test if they maintain a mutualistic relationship with their host grasses.

Some mutualistic fungal endophytes have been found in very high frequencies (0.75–1.00) in host populations (Redman *et al.*, 2002; Schardl *et al.*, 2004). In this study we have not identified any endophytic species occurring in most individuals. The highest frequencies of infection occurred with *Alternaria*, found in 63% and 55% of the *Ammophila* and *Elymus* plants, respectively (Table 4).

The mean number of endophytic species per location, as well as the diversity (H'), were significantly greater for *Ammophila* than from *Elymus* (Table 1). A similar observation was made in a survey of fungi from senescent leaves and stems in the same grasses (Apinis and Chesters, 1964). In our study, the mean number of species isolated from rhizomes did not significantly differ between both grasses, but in the case of leaves, that number was

significantly greater for *Ammophila*. The aerial parts of *Ammophila* plants are larger, and their ramets are much more densely clumped than those of *Elymus*. These anatomical differences could make *Ammophila* leaves more prone to trap aerial inoculum, and could explain why its leaves harbour more endophytes than those of *Elymus*.

Rhizomes supported a mycobiota as rich as that of leaves. When an equal number of leaf and rhizome samples were analyzed at each location, we found that the mean number of fungal species isolated from leaves or rhizomes were not significantly different in *Ammophila* or *Elymus*.

The variation in the geographical distribution of the endophytic species was remarkable. About two thirds of the species identified on each grass were found only at one location, 65.8% in *Ammophila* and 66.7% in *Elymus*. When species occurring at more than one location were considered, it was found that the distance among locations was inversely related to the similarity of endophytic assemblages (Fig. 3). Other situations where distance is inversely related to the similarity of endophytic assemblages have been described (Arnold *et al.*, 2003; Gange *et al.*, 2007). This effect of distance between plants on species composition is also supported by the fact that the similarity index of multihost species assemblages was greater between both grasses in the same location (0.32), than between both grasses (0.27), or each grass at different locations (*Ammophila* = 0.25, *Elymus* = 0.24). The mean similarity between both grasses at the same location was significantly greater than that among *Elymus* plants at different locations. These results suggest that in general, multihost species assemblages are more strongly influenced by the location than by fungal preference for one of the host plants. This effect of distance on species composition may explain why surveys of fungi fruiting on senescent stems and leaf litter of *Ammophila* and *Elymus* in particular locations of England or Portugal show very little overlap with the endophytic species we found (Apinis and Chesters, 1964; Dennis, 1983).

The 103 different species identified in both grasses belonged to 62 genera, 56 of which were in the *Ascomycota*. A predomi-

nance of ascomycetes has been observed in other surveys of endophytes and saprobes of grasses (Wirsel *et al.*, 2001; Wong and Hyde, 2001; Barata, 2002; Morakotkarn *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007). Twenty four endophytic taxa could not be identified to genus rank because they were sterile and their sequences were not similar to any taxon registered in the EMBL/Genbank database. It is a possibility that some of these isolates represent unknown species. This result also suggests that emphasis on the endophytic world may strengthen our still weak knowledge of fungal taxonomic diversity (Hawksworth and Rossman, 1997).

Only a few of the genera identified as endophytes in this survey contain pathogens previously described in *Elymus* (*Gaeumannomyces*, *Leptosphaeria*, *Phaeosphaeria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Curvularia*, *Fusarium*) or in *Ammophila* (*Lophodermium*, *Ustilago*, *Alternaria*) (Farr *et al.*, 1989). Although latent pathogens can behave for a time period as endophytes (Brown *et al.*, 1998; Mostert *et al.*, 2000; Photita *et al.*, 2004), this survey and a previous one (Sánchez *et al.*, 2007), indicate that pathogens do not appear to constitute a considerable fraction of the endophyte assemblage of grasses.

Although by definition endophytes are not expected to sporulate in their hosts, the spores of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Acremonium strictum*, and *Epicoccum nigrum*, can be abundant in indoor and outdoor air and dust samples (Fang *et al.*, 2005; Vesper *et al.*, 2008). This suggests that these endophytes may complete their life cycles in alternate substrates or hosts, or may be cryptic saprophytes, whose reproductive cycle starts with the death of the plant hosts (Promputtha *et al.*, 2007). Some of the endophytic species identified have known ecological roles such as insect pathogens (*Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*), pathogens in other plant (*Plectosphaerella cucumerina*, *Anthostomella eucalyptorum*) or animal species (*Phialemonium dimorphosporum*), or wood rotting fungi (*Phlebia radiata*).

In conclusion, this study shows that two sympatric grasses can support a very rich endophytic assemblage. In both grasses, rhizomes supported a mycobiota as rich as that

observed in leaves. The assemblage of each grass was dominated by several multihost species; species accumulation curves indicated that most of these dominant species were detected in the present survey. However, numerous singleton species that were detected are likely to increase in number if new plant samples or locations would have been studied. Variation in the composition of the mycobiota was very strong among locations, but when plural species were considered, an inverse relationship between distance among locations and similarity of endophyte assemblages was detected.

References

- Apinis, A.E. and Chesters, C.G.C. (1964). Ascomycetes of some salt marshes and sand dunes. Transactions of the British Mycological Society 47: 419-435.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D. and Kursar, T.A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecology Letters 3: 267-274.
- Arnold, A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology Reviews 21:51-66.
- Arnold, A.E. and Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?. Ecology 88: 541-549.
- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., and Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 26: 15649-15654.
- Barata, M. (2002). Fungi on the halophyte *Spartina maritima* in salt marshes. In: *Fungi in Marine Environments* (ed. K.D. Hyde). Fungal Diversity Research Series 7: 179-193.
- Bouton, J. and Easton S. (2005). Endophytes in forage cultivars. In: *Neotyphodium in Cold Season Grasses* (eds. C.A. Roberts, C.P. West and D.E. Spiers). Blackwell Publishing, Iowa: 327-340.
- Brown, K.B., Hyde, K.D. and Guest, D.I. (1998). Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. Fungal Diversity 1: 27-51.
- Collado, J., Platas, G., González, I. And Peláez, F. (1999). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. New Phytologist 144: 525-532.
- Collado, J., Platas, G., Paulus, B. and Bills, G.F. (2007). High throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. FEMS Microbiology Ecology 60: 521-533.
- Colwell, R.K. (2005). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from

- samples. Version 7.5. Persistent URL <purl.oclc.org/estimates>.
- Dennis, R.W.G. (1983). Fungi of *Ammophila arenaria* in Europe. *Revista de Biología* 12:15-48.
- Duong, L.M., Jeewon, R., Lumyong, S. and Hyde, K.D. (2006). DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. *Fungal Diversity* 23: 121-138.
- Fang, Z.G., Ouyang, Z.Y., Hu, L.F., Wang, X.K., Zheng, H. and Lin, X.Q. (2005) Culturable airborne fungi in outdoor environments in Beijing, China. *Science of the Total Environment* 350: 47-58.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P. and Rossman, A.Y. (1989). *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, USA.
- Fisher P.J., Graf F., Petrini L.E., Sutton B.C. and Wooley P.A. (1995). Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from the Swiss Alps. *Mycologia* 87: 319-323.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D. and Petrini, O. (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104: 1202-1212.
- Gange, A.C., Dey, S., Currie, A.F. and Sutton, B.C. (2007). Site-and species specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants. *Journal of Ecology* 95: 614-622.
- Gonthier, P., Gennaro, M. and Nicolotti, G. (2006). Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity* 21: 69-80.
- Gotelli, N.J. and Colwell, R.K. (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4: 379-391.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147: 617-630.
- Guo, L.D., Huang, G.R., Wang, Y., He, W.H., Zheng, W.H. and Hyde, K.D. (2003). Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycological Research* 107: 680-688.
- Hawksworth, D.L. and Rossman, A.Y. (1997). Where are all the undescribed fungi?. *Phytopathology* 87: 888-891.
- Higgins, K.L., Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Sarvate, S.D. and Lutzoni, F. (2007). Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 543-555.
- Hyde, K.D. and Soyong, K. (2007) Understanding microfungal diversity - a critique. *Cryptogamie Mycologie* 28: 281-289.
- Hubbard, C.E. (1984). Grasses. *A Guide to Their Structure, Identification, Uses and Distribution in the British Isles*. Penguin Books, London, UK.
- Kowalchuk, G.A., Gerards, S. and Woldendorp, J.A. (1997). Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3858-3864.
- Li, W.C., Zhou, J., Guo, S.Y. and Guo, L.D. (2007). Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity* 25: 69-80.
- Magurran, A.E. (2004). *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Márquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J. and Roossinck M.J. (2007) A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315: 513-515
- Morakotkarn, D., Kawasaki, H. and Seki T. (2006). Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. *FEMS Microbiology Letters* 266: 10-19.
- Mostert, L., Crous, P.W. and Petrini O. (2000). Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 54: 46-58.
- Neubert, K., Mendgen, K., Brinkmann, H. and Wirsal S.G.R. (2006). Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1118-1128.
- Pearson, W.R. (1990). Rapid and Sensitive Sequence Comparison with PASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* 183: 63-98.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and Hyde, K.D. (2001). Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 105: 1508-1514.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie E.H.C. and Hyde, K.D. (2004). Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Diversity* 16: 131-140.
- Pinnoi, A., Lumyong, S., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G. (2006). Biodiversity of fungi on the palm *Eleiodoxa conferta* in Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. *Fungal Diversity* 22: 205-218.
- Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R.L., Odenbach, K.J., Lowrey, T. and Natvig, D.O. (2008) Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Experimental Microbiology* 74: 2805-2813.
- Promputtha, I., Jeewon, R., Lumyong, S., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2005). Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). *Fungal Diversity* 20: 167-186
- Promputtha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Jeewon, R. (2007). A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53: 579-590.
- Rodriguez, R. and Redman, R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59: 1109-1114.

- Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. and Sullivan, T.J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
- Sánchez, S., Bills, G.F. and Zabalgoeazcoa, I. (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 27: 171-195.
- Schardl, C.L., Leuchtmann, A. and Spiering, M.J. (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 55: 315-340.
- Schulz, B. and Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Schulz, B., Guske, S., Dammann, U. and Boyle, C. (1998). Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25: 213-227.
- Seená, S. and Sridar, K.R. (2004). Endophytic fungal diversity of two sand dune wild legumes from the southwest coast of India. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 1015-1021.
- Stone, J.K., Polishook, J.D. and White, Jr. J.F. (2004). Endophytic fungi. In: *Biodiversity of Fungi: Inventory and monitoring methods* (eds. G.M. Mueller, G.F. Bills and M.S. Foster). Elsevier Academic Press, USA: 241-270.
- Vesper, S., McKinstry, C., Haugland, R., Neas, L., Hudgens, E., Heidenfelder, B. and Jane Gallagher, J. (2008). Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMIsm) values measured in Detroit homes of severely asthmatic children. *Science of the Total Environment* 394:192-196.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K.H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 13386-13391.
- Wang, Y., Guo, L.D. and Hyde, K.D. (2005). Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. *Fungal Diversity* 20: 235-260.
- Wei, Y.K., Gao, Y.B., Zhang, X., Su, D., Wang, Y.H., Xu, H., Lin, F., Ren, A.Z., Chen, L. and Nie, L.Y. (2007). Distribution and diversity of *Epichloë/Neotyphodium* fungal endophytes from different populations of *Achnatherum sibiricum* (Poaceae) in the Inner Mongolia Steppe, China. *Fungal Diversity* 24: 329-345.
- White, I.R. and Backhouse, D. (2007). Comparison of fungal endophyte communities in the invasive panicoid grass *Hyparrhenia hirta* and the native grass *Botriochloa macra*. *Australian Journal of Botany* 55: 178-185.
- White, T.J. Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press, USA: 315-322.
- Wirsal, S.G.R., Leibinger, W., Ernst, M. and Mendgen, K. (2001). Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist* 149: 589-598.
- Wong M.K.M. and Hyde, K.D. (2001). Diversity of fungi on six species of *Graminae* and one species of *Cyperaceae* in Hong Kong. *Mycological Research* 105: 1485-1491.
- Zabalgoeazcoa, I. (2008). Fungal endophytes and their interactions with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 138-146.
- Zak, J.C. and Willig, M.R. (2004). Fungal biodiversity patterns. In: *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods* (eds. G.M. Mueller., G.F. Bills, and M.S. Foster) Elsevier Academic Press, USA: 59-75.